



Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Química e Farmácia

# **NOVAS PERSPETIVAS TERAPÊUTICAS NA FIBROSE CÍSTICA**

**Lília Cristina Marques Leonardo**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob orientação de:**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Margarida Grenha**

**2014**



Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Química e Farmácia

**NOVAS PERSPETIVAS TERAPÊUTICAS  
NA FIBROSE CÍSTICA**

**Lília Cristina Marques Leonardo**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob orientação de:**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Margarida Grenha**

**2014**

# **NOVAS PERSPETIVAS TERAPÊUTICAS NA FIBROSE CÍSTICA**

## **DECLARAÇÃO DE AUTORIA DO TRABALHO**

“Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluídas”



---

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esta Dissertação ao meu avô Zé e à minha avó Maria, que lá do Céu, estarão certamente radiantes, por mais uma meta alcançada no meu percurso.*

## **AGRADECIMENTOS**

Este espaço é dedicado a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação. A todos estou profundamente grata.

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Ana Margarida Grenha, minha orientadora, pelo seu rigor científico, pelo seu profissionalismo, pelo seu constante empenho e preciosa compreensão. Agradeço-lhe, não apenas como orientadora desta dissertação, mas também, como docente de várias disciplinas, ao longo do curso. Fui cativada pela sua exigência e perfeccionismo. Muito Obrigada Professora Ana Grenha pelo seu exemplo.

Em segundo lugar, quero agradecer a todos os docentes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, por toda a aprendizagem imprescindível à minha formação.

Às minhas colegas de curso, Stephany, Patrícia e Cláudia, quero deixar um agradecimento muito especial pela sua ajuda, amizade e por todas as palavras encorajadoras que sempre me transmitiram.

Agradeço à Dra Carmina Martins, Diretora dos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar do Algarve, por ter confiado em mim.

À Estela, minha amiga especial, agradeço por me ter aturado nos meus piores dias.

Aos meus pais e irmã, faltam-me palavras para agradecer e descrever o seu único e especial contributo para que chegasse o dia da conquista. Sem eles, não teria sido possível.

Agradeço a Deus pela Sua presença na minha Vida!

*“Meus sonhos eu transformo em meta,  
depois luto e por fim conquisto,  
é sempre assim, essa é minha lei!”*

*Karla Moura*

## RESUMO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença hereditária autossômica recessiva, grave e comum na população caucasiana, afetando vários órgãos. A principal causa de mortalidade associada à FC é a doença pulmonar, devido à falha das células epiteliais das vias respiratórias na expressão de uma proteína funcional, a partir do gene regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR).

A FC tem sido alvo de bastantes intervenções terapêuticas farmacológicas e genéticas. As terapêuticas convencionais, atualmente disponíveis, que incluem desde os antibióticos inaláveis aos anti-inflamatórios sistêmicos e aos mucolíticos, têm revelado aumentar a qualidade e expectativa de vida. No entanto, estes fármacos não tratam o defeito básico causador da FC, isto é, a ausência de CFTR funcional. Consequentemente, a FC foi considerada como candidata para a terapêutica genética, quando o gene responsável pela doença foi isolado em 1989. Os genes terapêuticos podem ser administrados nos tecidos alvo por meio de transportadores, os quais são geralmente definidos como vetores. Os vetores virais e os lipossomas catiónicos são os mais utilizados. Os lipossomas são um dos sistemas de liberação de fármacos de maior sucesso, aplicando nanotecnologia para potenciar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos tóxicos. Muitos estudos demonstraram que a transferência de genes mediada por lipossomas catiónicos pode ser um método eficaz para a liberação *in vivo* de ADN plasmídico contendo o gene CFTR, nas vias respiratórias de doentes com FC. No entanto, os ensaios clínicos realizados mostraram que os níveis de expressão do gene eram demasiado baixos para oferecer benefício terapêutico, pelo que a terapia genética na FC permanece apenas na fase de investigação.

Uma alternativa à terapêutica genética, que se mostra mais promissora, é o desenvolvimento de pequenos compostos que têm como alvo as mutações específicas da CFTR. Esses novos compostos foram e têm sido desenvolvidos com base numa melhor compreensão da estrutura e disfunção da CFTR na FC. O Ivacaftor (VX -770), aprovado em 2012 pela FDA, é um potenciador da CFTR que foi projetado para aumentar o tempo que os canais da CFTR permanecem abertos na superfície da célula. Os ensaios clínicos mostraram efeitos benéficos na função pulmonar, número de exacerbações respiratórias, marcadores da função da CFTR, nutrição e qualidade de vida em doentes com FC com a mutação G551D, constituindo assim uma promessa terapêutica para a FC.

---

**Palavras-chave:** Fibrose Cística (FC), Ivacaftor, Lipossomas Catiónicos, Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Cística (CFTR), Terapêutica Genética

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a common serious, inherited autosomal recessive disease in the caucasian population, affecting many organs. The major cause of mortality in CF is lung disease, due to the failure of airway epithelial cells to express a functional protein of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene.

CF has been the target of most pharmacological and genetic therapeutics interventions. The conventional therapies currently available, which include inhaled antibiotics, systemic anti-inflammatories and mucolytics, have shown to increase the quality of life and its expectancy. However, these drugs do not treat the underlying defect causing CF, that is, the lack of functional CFTR. Consequently, CF was considered a candidate for gene therapy when the gene responsible for disease was isolated in 1989. Therapeutic genes can be administered into target tissues via gene carriers commonly defined as vectors. The viral and cationic liposomes are the most frequently proposed vectors. Liposomes are one of the most successful drug delivery systems, applying nanotechnology to potentiate the therapeutic efficacy and reduce toxicity. Many studies demonstrated that cationic liposome-mediated gene transfer can be an effective method for *in vivo* delivery of plasmid DNA containing the CFTR gene into the airways of CF subjects. Nevertheless, the respective clinic trials showed that levels of gene expression were too low to offer therapeutic benefit and, consequently, CF gene therapy remains only under research.

An alternative to gene therapy is the development of small compounds that target specific CFTR mutations. These exciting new developments are based on improved understanding of CFTR structure and dysfunction in CF. Ivacaftor (VX-770), FDA licensed in 2012, is a CFTR potentiator that was designed to increase the time that activated CFTR channels at the cell surface remain open. Clinical trials have shown beneficial effects on lung function, number of respiratory exacerbations, surrogate markers of CFTR function, nutrition and quality of life in CF patients with a G551D mutation, making this medicine a great therapeutic promise.

---

**Keywords:** Cationic Liposomes, Cystic Fibrosis (CF), Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), Gene Therapy, Ivacaftor



## **INDICE**

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Visão Geral	2
1.2. Breve História da Fibrose Cística	3
1.3. Genética da Fibrose Cística	4
1.4. Fisiopatologia	10
1.5. Manifestações Clínicas	11
1.5.1. Doença Pulmonar	12
1.5.2. Comprometimento Pancreático	13
1.5.3. Doença Hepática	14
2. OBJETIVO	15
3. METODOLOGIA	17
4. TERAPÊUTICA DA FIBROSE CÍSTICA	19
4.1. Aspectos Gerais	20
4.2. Terapêutica da Doença Pulmonar	21
4.2.1. Terapêutica da Infecção	21
4.2.2.. Terapêutica Anti-inflamatória	24
4.2.3. Eliminação Mucociliar	26
4.3. Terapêutica da Insuficiência Pancreática	27
4.4. Terapêuticas Alternativas – Terapêutica Antioxidante	28
5. NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	36
5.1. Terapêutica Genética	37
5.1.1. Abordagem Lipossomal	40
5.1.1.1. Os Lipossomas Catiônicos na Terapêutica da Fibrose Cística	45
5.2. Terapêuticas Moduladoras da CFTR	55

5.2.1. Corretores da CFTR	55
5.2.2. Supressores da CFTR	56
5.2.3. Potenciadores da CFTR	57
5.2.3.1. A aplicação do Ivacaftor na Terapêutica de Fibrose Cística	59
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

## **INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.1** – Localização do gene CFTR no cromossoma 7 na posição 7q31

**Figura 1.2** – Modelo que mostra a estrutura proposta para o Regulador Transmembranar da Fibrose Cística (CFTR)

**Figura 1.3** – Mutação delta F508

**Figura 1.4** – Classes de mutações da CFTR

**Figura 1.5** – Fisiopatologia da Fibrose Cística

**Figura 1.6** – Modelo da Doença Pulmonar na Fibrose Cística

**Figura 4.1** – Distribuição de espécies bacterianas na FC por idades dos doentes

**Figura 4.2** – Modelo que descreve a relação entre o stress oxidativo, o estado nutricional e o estado clínico da Fibrose Cística

**Figura 5.1** - Barreiras fisiológicas e não fisiológicas para entrada de ácidos nucleicos nas células

**Figura 5.2** – Estrutura de lipossoma unilamelar

**Figura 5.3** – Estrutura de lipossoma multilamelar

**Figura 5.4** – Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas solubilizadas na fase aquosa e na bicamada lipídica

**Figura 5.5** – Possíveis mecanismos de interação dos lipossomas com as células do organismo

**Figura 5.6** – Exemplos de fosfolípidos utilizados na preparação de lipossomas e suas respectivas temperaturas de transição de fase (T<sub>c</sub>) e a carga da molécula

**Figura 5.7** – AmBisome, sistema lipossomal unilamelar

**Figura 5.8** - Estrutura de um fosfolípido catiónico 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano (DOTAP)

**Figura 5.9** – Estrutura química dos lípidos usados na formação de lipossomas catiónicos

**Figura 5.10** – Mecanismos de entrada nas células dos complexos lipossomas catiónicos – ADN plasmídico.

**Figura 5.11** – Representação esquemática da ação de medicamentos potenciadores da CFTR com a mutação G551D

**Figura 5.12** – Representação esquemática da ação conjunta de medicamentos corretores e potenciadores da CFTR com a mutação delta F508

**Figura 5.13** – Estrutura química do Ivacaftor

**Figura 5.14** – O ivacaftor aumenta a abertura do canal CFTR

**Figura 5.15** – O ivacaftor restaura a condutância transmembranar da proteína reguladora CFTR na FC com a mutação G551D

## **INDICE DE TABELAS**

**Tabela I.1** – Manifestações Clínicas da Fibrose Cística

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABC</b>	<i>do inglês, ATP-binding-cassete</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleíco
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios Não-Esteróides
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleíco
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>cAMP</b>	AMP cíclico – monofosfato de adenosina cíclico
<b>CFTR</b>	Regulador de Condutância Transmembranar da Fibrose Cística ( <i>do inglês, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> )
<b>Cl</b>	Cloro
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ião Cloreto
<b>Delta F508</b>	Mutação delta F508 da CFTR (Deleção de uma fenilalanina na posição 508)
<b>DMPG</b>	Diesteroilfosfatidilglicerol
<b>rhDNase</b>	DNase recombinante humana
<b>DPOC</b>	Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
<b>EMA</b>	<i>do inglês, European Medicine Agency</i> (Agência Europeia do Medicamento)
<b>ERO</b>	Espécie reativa de oxigénio
<b>FC</b>	Fibrose Cística
<b>FDA</b>	<i>do inglês, Food and Drug Administration</i>
<b>FEV1</b>	Volume expiratório forçado no 1º segundo (volume de ar expirado no primeiro segundo do sopro)
<b>GSH</b>	Glutationa na forma reduzida
<b>GSHPx</b>	Glutationa peroxidase extracelular

<b>GSSH</b>	Dissulfeto de glutathione
<b>G551D</b>	Mutação da CFTR de classe III (alteração de uma glicina para ácido aspártico no codão 551)
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IP</b>	Insuficiência Pancreática
<b>K</b>	Potássio
<b>MDR</b>	<i>do inglês, multidrug resistance</i>
<b>MPEG</b>	metoxipolietilenoglicol
<b>MSD</b>	Domínio Transmembranar ( <i>do inglês, membrane spanning domains</i> )
<b>Na</b>	Sódio
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADP<sup>+</sup></b>	<i>do inglês, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NADPH</b>	Forma reduzida do NADP <sup>+</sup>
<b>NBD</b>	Domínio de ligação de nucleótidos ( <i>do inglês, nucleotide binding domain</i> )
<b>NO<sup>•</sup></b>	Óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anião superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCR</b>	<i>do inglês, Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PEG</b>	Polietilenoglicóis
<b>PKA</b>	Proteína cinase dependente de cAMP
<b>8-iso-PGF<sub>2α</sub></b>	isoprostano
<b>R</b>	Domínio de regulação
<b>RBC</b>	<i>do inglês, Red blood cell</i> - eritrócitos

<b>RLO</b>	Radicais livres de oxigénio
<b>RO<sup>•</sup></b>	Radical alcoxil
<b>ROO</b>	Radical peroxil
<b>SeGPx</b>	Glutathione peroxidase dependente de selénio
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
<b>TIP</b>	Pó inalado TOBI <sup>®</sup>
<b>TOBI<sup>®</sup></b>	Tobramicina



## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1. Visão Geral

A Fibrose Cística é uma doença hereditária autossômica recessiva, também denominada por “mucoviscidose”,<sup>1-6</sup> potencialmente letal.<sup>2,5</sup> Trata-se de uma doença causada por mutações no gene, localizado no braço longo do cromossoma 7, locus q31,<sup>2,3,4</sup> responsável pela codificação de uma proteína transmembranar, a CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*).<sup>1,3,4,7-11</sup> Esta proteína funciona como um canal responsável pelo transporte de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e água através das membranas apicais das células dos epitélios de alguns órgãos.<sup>1,10</sup> Os principais órgãos, nos quais se pode encontrar este canal de íons, são criptas intestinais, pâncreas, vias biliares, aparelho respiratório, aparelho reprodutor, glândulas sudoríparas e túbulos renais.<sup>10</sup>

A distribuição da proteína CFTR, bem como a alteração da viscosidade das secreções, consequência da sua disfunção, explica o envolvimento sistémico da Fibrose Cística.<sup>10</sup> A doença ocorre com uma frequência estimada de 1 em 2500 a 3000 nascidos vivos na raça caucasiana.<sup>2,6,10,12</sup> Trata-se da doença autossômica recessiva mais comum nos caucasianos, afetando aproximadamente 28000 doentes nos Estados Unidos e aproximadamente 36000 doentes na Europa.<sup>13</sup> É menos frequente em negros (1 em 17000) e rara em asiáticos, sendo 1 em 90000 na população americana.<sup>2,12</sup> Apesar da sua incidência ser na raça branca, existe uma grande variabilidade nos diferentes países europeus, destacando-se a Irlanda com maior incidência (1 em 1461) e a Finlândia com menor incidência (1 em 25000).<sup>10,14</sup>

O quadro clínico da Fibrose Cística é determinado pelos fenómenos obstrutivos decorrentes de secreções espessas e viscosas em diversos órgãos.<sup>1,2,4</sup> Classicamente, as características clínicas da doença caracterizam-se por infeção bacteriana das vias aéreas e seios da face, má digestão de gorduras, consequência da insuficiência pancreática, infertilidade masculina (azoospermia obstrutiva) e aumento da concentração de íons cloreto e sódio no suor.<sup>1,2,3,4</sup>

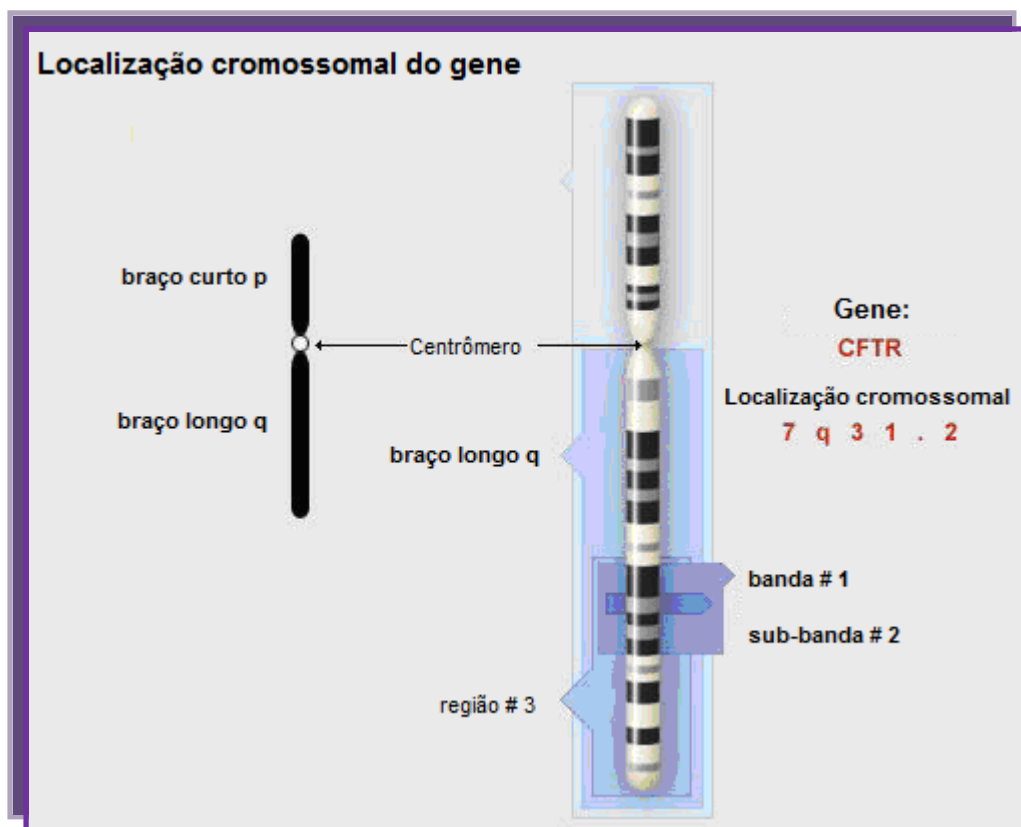
A esperança média de vida em doentes com FC tem aumentado de forma constante ao longo dos últimos 25 anos, de um tempo médio de sobrevivência de 25 anos em 1985 para 37 anos em 2011.<sup>13</sup> Tem sido descrito por diversos autores que o diagnóstico precoce da doença, bem como o uso da terapêutica adequada são responsáveis pela melhoria da qualidade de vida e aumento da taxa de sobrevivência de doentes com Fibrose Cística.

### 1.2. Breve História da Fibrose Cística

Nos séculos XVIII e XIX, a Fibrose Cística era mencionada pelo folclore europeu que dizia que crianças com suor salgado morreriam precocemente.<sup>1,14</sup> Em 1905, *Landsteiner* descreveu o íleo meconial,<sup>2,14</sup> ou seja, uma forma de obstrução intestinal em recém-nascidos. O mecônio ou substância verde escura que forma as primeiras fezes do recém-nascido, é grosso e, por isso a sua mobilidade no intestino é mais lenta do que o normal. Assim, se o mecônio for muito grosso irá obstruir o intestino, o que poderá ter como consequência a perfuração da parede intestinal ou a torção do intestino.<sup>15</sup> *Landsteiner* relacionou o íleo meconial com insuficiência pancreática exócrina, devendo-se a este investigador a primeira descrição anatomopatológica da doença.<sup>2,14</sup> Em 1935, *Fanconi* descreveu doentes que apresentavam características clínicas da doença celíaca, mas com insuficiência pancreática exócrina associada e doença pulmonar.<sup>2,14</sup> A Fibrose Cística foi descrita pela primeira vez, como entidade patológica, em 1938, nos Estados Unidos, pela patologista *Dorothy Andersen*.<sup>1,2,14</sup> *Farber* criou o termo “mucoviscidose” em 1945<sup>1</sup> e em 1953 *Di Sant’ Agnese et al* realizaram a primeira observação da secreção aumentada de eletrólitos no suor.<sup>14</sup> Em 1959, *Gibson e Cooke* padronizaram o teste do suor, padrão áureo para o diagnóstico da FC até hoje.<sup>1,14</sup> Foi documentada, em 1968, por *Shwachman e Holsclaw* a obstrução do tubo deferente e dos tubos seminíferos, o que justifica a infertilidade da maioria dos homens com FC.<sup>14</sup> Em 1982-1983, *Quinton et al* começaram a perceber o defeito na concentração de iões cloro nas células epiteliais dos ductos das glândulas sudoríparas dos doentes.<sup>2,14</sup> *Knowlton e Wainwright*, investigadores de diferentes instituições, localizaram o gene responsável pela doença no cromossoma 7.<sup>1,2,14</sup> *Lap-Chee Tsui e Francis Collins et al*, em 1989, utilizando técnicas de clonagem, isolaram e sequenciaram o gene no braço longo do cromossoma 7 (locus 7q31).<sup>1,2,14</sup> A proteína codificada por este gene foi denominada, pelo mesmo grupo de investigadores, como “*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*” (CFTR).<sup>1</sup>

### 1.3. Genética da Fibrose Cística

Como referido anteriormente, o gene responsável pela Fibrose Cística foi localizado no braço longo do cromossoma 7 (**locus 7q31**) (Fig. 1.1). Trata-se de um gene com cerca de 250 Kb de ADN genómico, é constituído por 27 exões que representam 5% do ADN genómico e codifica um ARNm transcrito de 6,5 Kb. Esse ARNm é transcrito numa proteína de 1480 aminoácidos denominada CFTR (*Regulator Transmembrane Conductance Cystic Fibrosis*)<sup>2,16,17</sup> com peso molecular de 168 kDa.<sup>4</sup>

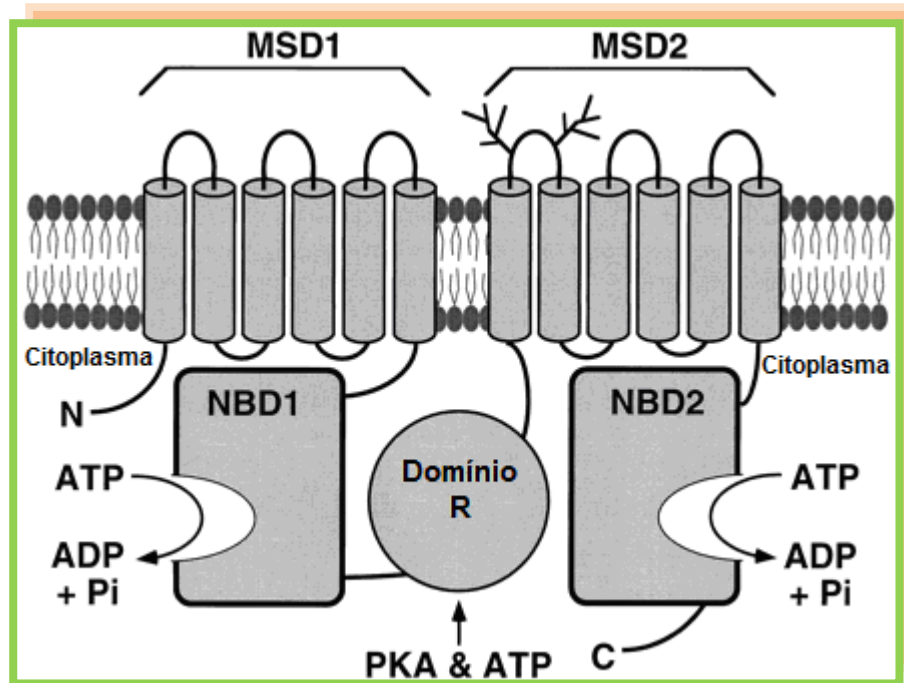


**Figura 1.1** – Localização do gene CFTR no cromossoma 7 na posição 7q31. *Adaptado de 18.*

O padrão de expressão do gene CFTR é restrito às células epiteliais do trato respiratório (transcrito em concentrações baixas), sendo altamente expresso no epitélio do ducto pancreático, no epitélio intestinal,<sup>2,16</sup> glândulas salivares, sudoríparas e no trato reprodutor.<sup>2,7</sup>

A proteína codificada pelo gene CFTR consiste em dois domínios transmembranares (*MSD – membrane-spanning domain*), contendo cada domínio 6 segmentos hidrofóbicos; possui dois domínios de ligação de nucleótidos denominados NBD1 e NBD2 (*NBD – nucleotide binding*

*domains*) e ainda um domínio regulador R citoplasmático (Fig. 1.2) que contém múltiplos sítios alvo para fosforilação por proteínas cinases.<sup>1,10,16</sup>



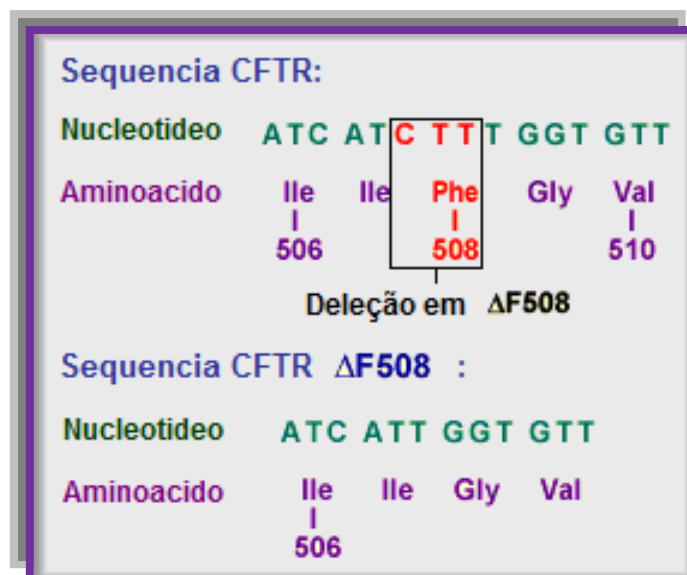
**Figura 1.2** – Modelo que mostra a estrutura proposta para o regulador transmembranar da fibrose cística (CFTR). MSD, domínio transmembranar; NBD, domínio de ligação de nucleótidos; R, domínio regulador; PKA, proteína cinase dependente de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Adaptado de 19.

Esta proteína pertence à família das proteínas ABC (*ATP-Binding Cassette*),<sup>10,16</sup> na qual se incluem proteínas que participam na regulação do transporte transmembranar de iões, aminoácidos, bactérias e da proteína de resistência a fármacos (*mammalian multidrug resistance – MDR*).<sup>10</sup> A proteína funciona como um canal direto na membrana epitelial, regulado por cAMP, que realiza o transporte de iões cloreto através da membrana apical e o interior da célula.<sup>10,16</sup>

A atividade deste canal CFTR pode ser modulada através de diferentes mecanismos, incluindo os que envolvem fosforilação e desfosforilação. A ativação do canal ocorre, numa primeira fase, no domínio regulador R, o qual se torna fosforilado por uma proteína cinase dependente de cAMP (PKA).<sup>2,16</sup> Seguidamente, o ATP intracelular liga-se e é hidrolisado pelo NBD1 e, consequentemente, o canal abre-se e os iões cloreto são transportados. A ligação e hidrólise de ATP pelo NBD2 levam ao encerramento do canal.<sup>16</sup>

Desde que o gene CFTR foi identificado, já foram identificadas 1940 mutações, de acordo com os dados apresentados pelo Banco de Dados de Mutações da Fibrose Cística (Cystic Fibrosis Mutation Database<sup>20</sup> – [www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr) – acesso em Julho de 2013). Mutações de todo o tipo têm sido encontradas ao longo da região codificante, bem como da região promotora do gene, sendo que a maior parte das alterações envolve um ou poucos nucleótidos.<sup>1,16</sup>

Foi identificada uma deleção de três pares de bases, adenosina-timina-timina (ATT) no exão 10 do gene CFTR, o que origina a perda de um único aminoácido – fenilalanina – na posição 508 da proteína<sup>2,17</sup> (Fig. 1.3). Essa mutação, tradicionalmente, conhecida como delta F508, em que “delta” significa supressão e “F” é a abreviatura do aminoácido fenilalanina, é a mais frequente nos doentes com FC (aproximadamente 70%).<sup>2,16,17</sup>



**Figura 1.3** – Mutação delta F508. *Adaptado de 21.*

As diversas mutações no gene CFTR têm diferentes efeitos sobre a síntese, estrutura ou funcionamento da proteína. Estas mutações podem ser classificadas em diferentes grupos consoante os mecanismos pelos quais é interrompida a função normal da CFTR:<sup>16,22,23</sup>

a) Classe I – Mutações que afetam a biossíntese da proteína

Inibem a síntese de proteína estável ou produzem baixos níveis de proteína madura.<sup>16,22</sup> As mutações G542X e W1282X são as representantes mais comuns desta classe e estão relacionadas com os fenótipos mais graves da FC.<sup>16</sup> Cerca de 7% dos doentes apresentam mutações pertencentes a esta classe.<sup>10</sup> (Fig. 1.4)

b) Classe II – Mutações que afetam a maturação da proteína

A proteína CFTR é sintetizada mas não sofre os processos de maturação e migração adequados até à membrana celular para funcionar como um canal de cloreto. A proteína sofre degradação prematura.<sup>22</sup> A principal representante desta classe é a mutação delta F508.<sup>10,16,17,22</sup> Cerca de 85% dos doentes apresentam mutações pertencentes a esta classe.<sup>10</sup> (Fig. 1.4)

c) Classe III – Mutações que afetam a regulação do canal de cloreto

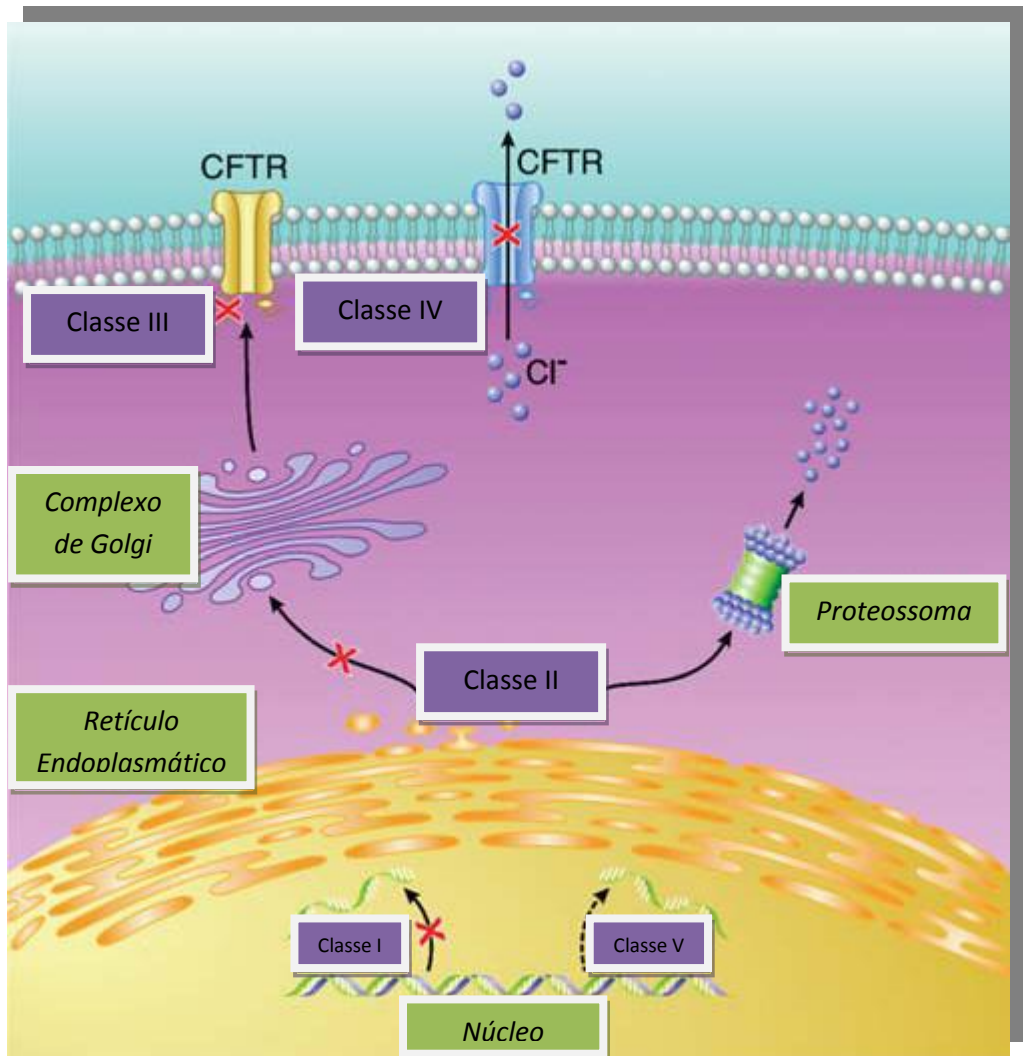
Ocorre uma redução da resposta ao ATP com consequente diminuição da sua ligação à proteína CFTR e hidrólise. As mutações desta classe estão geralmente presentes nos NBD e no domínio R, interferindo na interação desses domínios com o ATP intracelular com consequente alteração da regulação do canal iónico e diminuição da sua atividade.<sup>10,16</sup> A mutação mais conhecida, representante desta classe, é a G551D.<sup>1,22</sup> (Fig. 1.4)

d) Classe IV – Mutações que afetam a condutância do cloreto

As mutações desta classe provocam um fluxo defeituoso dos eletrólitos através do canal CFTR (diminuição da condutância<sup>1,22</sup> por alteração dos domínios transmembranares 1 e 2). São exemplos de mutações desta classe: R117H, R334W e R347P).<sup>1,10,16</sup> (Fig. 1.4)

e) Classe V – Mutações que alteram a quantidade de proteína na membrana

Esta classe de mutações caracteriza-se por uma menor síntese de CFTR, mas a função da proteína é normal.<sup>10,22</sup> As mutações características desta classe são A455E e 3849+10Kb.<sup>22</sup> (Fig. 1.4)



**Figura 1.4** – Classes de mutações na CFTR. As mutações da CFTR são classificadas com base no resultado anormal da síntese de CFTR (classe I), processamento (classe II), regulação do canal de cloro (classe III), condutância do canal de cloro (classe IV) e quantidade da proteína na célula (classe V). *Adaptado de 24.*

f) Classe VI – Mutações que diminuem a estabilidade da proteína

Trata-se de uma classe adicional de mutações proposta por *Haardt* e seus colaboradores, em 1999, na qual estão incluídas as proteínas que perderam resíduos na região C terminal ou que resultam de deleções de grandes resíduos de aminoácidos que podem não ser essenciais mas que levam à redução drástica da estabilidade da proteína. Esta classe de mutações é responsável pelo aparecimento de fenótipos graves como é o caso da mutação Q1412X.<sup>1</sup>



Existe uma grande variabilidade na frequência da Fibrose Cística e das principais mutações que causam a doença de acordo com a descendência dos indivíduos, ou seja, o risco de um indivíduo com FC ter filhos afetados pela doença, nas suas formas moderada ou grave, depende do seu parceiro. As mutações denominadas graves, nas quais a proteína CFTR funcional está ausente, associam-se à insuficiência pancreática,<sup>1,16</sup> início precoce dos sintomas, elevados níveis de cloreto no suor e infertilidade masculina.<sup>16</sup> Por outro lado, as mutações “intermédias” cujo efeito é mais discreto na função da proteína ou que permitem que uma pequena quantidade da proteína funcional seja produzida, são, normalmente, associadas à insuficiência pancreática, diagnóstico tardio, baixos níveis de cloreto no suor e comprometimento pulmonar médio.<sup>16</sup>

A correlação entre o genótipo e o fenótipo da doença pulmonar tem sido mais difícil de estabelecer, visto que poucas mutações no gene CFTR foram associadas à doença pulmonar na FC.<sup>1,10,16</sup> Doentes com mutações das classes I e II em ambos os cromossomas apresentaram menores valores da função pulmonar, maior risco de desenvolvimento de doença pulmonar moderada a grave e menor taxa de sobrevivência pela doença pulmonar quando comparados com doentes com pelo menos uma mutação da classe III, IV ou V.<sup>10</sup> Doentes que apresentam a mutação A455E (Classe V – Mutações que alteram a quantidade de proteína na membrana) parecem ter uma menor taxa de declínio da função pulmonar e algumas mutações que afetam o *splicing* foram correlacionadas com um baixo risco de infecção por *P. aeruginosa*.<sup>16</sup>

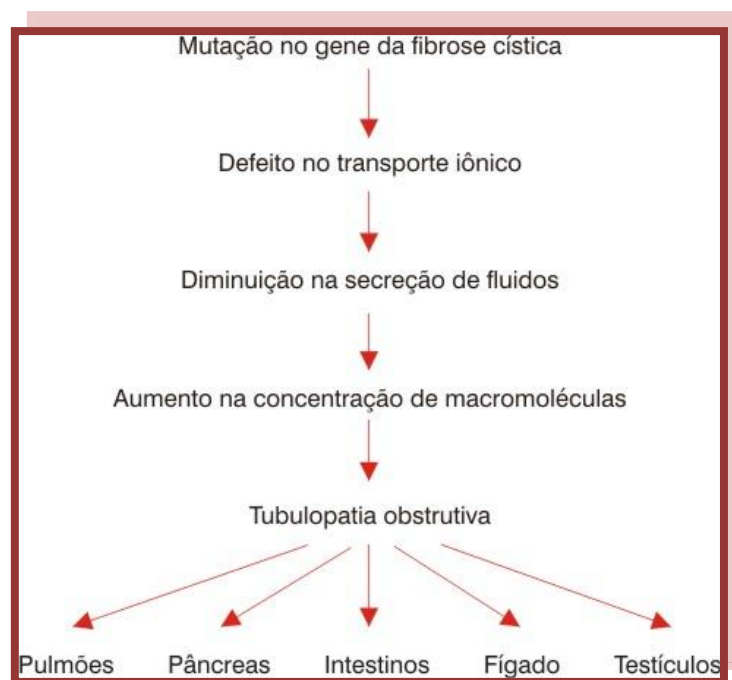
Todos os estudos têm demonstrado uma grande variação da função pulmonar entre doentes portadores de FC com o mesmo genótipo incluindo homozigotas delta F508.<sup>1</sup>

A correlação genótipo-fenótipo varia com os sistemas/órgãos que se considerem, estando menos estabelecida a nível da doença pulmonar, existindo uma grande variação individual,<sup>10,23</sup> o que sugere que, para além da variação da gravidade produzida pelos efeitos das diferentes mutações e de polimorfismos intragénicos (alelos complexos) no gene CFTR, existem outros elementos genéticos, tais como polimorfismos em genes mediadores inflamatórios ou responsáveis pela resposta inata, que modulam a expressão da doença.<sup>1,23</sup>

### 1.4. Fisiopatologia da Fibrose Cística

A disfunção da proteína CFTR, causada pela ocorrência de mutações, origina a ausência de atividade ou funcionalidade parcial da CFTR, o que se observa pela diminuição da permeabilidade ao cloreto da membrana celular, o que acarreta dificuldades no transporte e secreção deste íon<sup>13,25-26</sup>. Assim, a concentração do íon cloreto aumenta na superfície do epitélio de vários órgãos, aumentando a eletronegatividade com consequente aumento do fluxo do íon sódio para garantir o equilíbrio eletroquímico, e de água através do processo de osmose.<sup>13</sup> Consequentemente, ocorre desidratação das secreções mucosas e aumento da viscosidade favorecendo a obstrução dos ductos, acompanhada de reação inflamatória e posterior processo de fibrose (Fig. 1.5).<sup>4,14</sup>

Cada órgão, cuja atividade normal depende do funcionamento da proteína CFTR (pâncreas, intestino, pulmões, glândulas sudoríparas) expressa a disfunção consoante a sensibilidade que tem ao déficit funcional da proteína.<sup>25-26</sup>



**Figura 1.5** – Fisiopatologia da Fibrose Cística. *Adaptado de 14.*

### 1.5. Manifestações Clínicas

O defeito da proteína CFTR acomete células de vários órgãos, pelo que a Fibrose Cística é considerada uma doença multissistêmica e pleomórfica,<sup>4,14</sup> apresentando um grande espectro de manifestações clínicas que podem ocorrer precocemente ou na idade adulta.<sup>14</sup> Esta diversidade de manifestações clínicas apresenta diferentes graus de gravidade e diferentes formas de apresentação, que dependem de vários fatores como o tipo de mutação e a idade do doente.<sup>4</sup>

O acometimento pulmonar é a principal causa de morbidade e mortalidade dos doentes com FC.<sup>14,27,29-30</sup> As condutas mais recentes na prevenção e tratamento da doença pulmonar e da intervenção precoce no estado nutricional, têm aumentado a longevidade dos doentes com FC,<sup>28,31</sup> o que proporciona uma maior incidência de complicações extrapulmonares, nas quais se destaca a diabetes relacionada com a FC.<sup>28</sup> A causa deste tipo de diabetes é resultado da disfunção da ilhota pancreática causada pela inflamação e fibrose como consequência da secreção exócrina viscosa.<sup>28</sup>

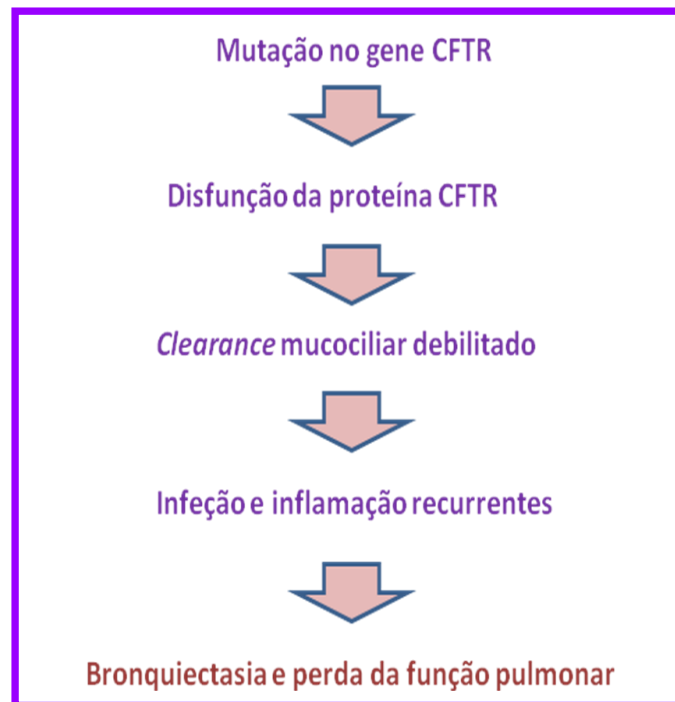
As manifestações clínicas mais comuns na FC são: tosse crónica, diarreia crónica e desnutrição, no entanto, a doença pode manifestar-se de várias outras formas, dado tratar-se de uma doença multissistêmica,<sup>2</sup> tal como já referido anteriormente. Na tabela 1.1 são apresentadas as manifestações clínicas mais frequentes:

**Tabela I.1** – Manifestações Clínicas da Fibrose Cística. *Adaptado de 10.*

Doença Pulmonar
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonização/infeção com agentes típicos da FC (<i>S. aureus</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>B. cepacia</i>)</li> <li>- Tosse persistente</li> <li>- Alterações radiológicas persistentes (bronquiectasias, infiltrados e hiperinsuflação)</li> <li>- Obstrução das vias aéreas</li> <li>- Pólipos nasais e alterações radiológicas dos seios perinasais</li> <li>- Hipocratismo digital</li> </ul>
Alterações Digestivas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prolapso retal e DIOS</li> <li>- Insuficiência pancreática e pancreatite recorrente</li> <li>- Doença hepática crónica com evidência clínica ou histológica de cirrose biliar ou multitubular</li> </ul>
Síndrome de perdas salinas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alcalose metabólica</li> <li>- Deficiência aguda de sal</li> </ul>
Alterações urogenitais
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Azoospermia obstrutiva (agenesia dos ductos de Wolf)</li> </ul>

### 1.5.1. Doença Pulmonar

A acumulação de muco nas vias respiratórias inferiores é uma das características chave da fisiopatologia da doença pulmonar (Fig. 1.6), bem como a presença de reação inflamatória, predominantemente, neutrofílica e infeção bacteriana.<sup>32</sup> O elevado número de neutrófilos deve-se ao fato da obstrução crónica das vias respiratórias, causada por secreções viscosas, ser logo seguida pela colonização por bactérias patogénicas, incluindo *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, sendo que a prevalência de cada tipo de bactérias varia com a idade de cada doente.<sup>32</sup> A colonização e infeção respiratória por estas bactérias originam um dano tecidual irreversível.<sup>14</sup>



**Figura 1.6** – Modelo da doença pulmonar na Fibrose Cística. *Adaptado de 13.*

A manifestação respiratória mais comum é a tosse crônica persistente a qual pode ocorrer desde as primeiras semanas de vida.<sup>14</sup> O curso clínico da doença pulmonar apresenta uma predisposição à sinusite, bronquite, pneumonia, bronquiectasia, fibrose e falência respiratória, verificando-se, também, uma diminuição da tolerância ao exercício físico com a evolução da doença.<sup>14</sup>

As alterações pulmonares iniciam-se nas vias respiratórias inferiores mas são progressivas, evoluindo em quase 100% para o surgimento de “*cor pulmonale*”,<sup>14,27</sup> ou seja, para o aparecimento de alterações na estrutura e função do ventrículo direito com consequente insuficiência cardíaca.

### 1.5.2. Comprometimento Pancreático

A insuficiência pancreática exócrina está presente na maioria dos doentes com Fibrose Cística. A função pancreática pode variar entre o normal funcionamento pancreático e vários graus de insuficiência, verificando-se uma tendência para piorar à medida que a idade do doente avança.<sup>33-36</sup> A doença pancreática exócrina apresenta manifestações clínicas em 85-

90% dos doentes, enquanto a insuficiência pancreática endócrina é menos comum, mas 30-50% dos doentes com FC apresentam intolerância à glicose e 1-2% requerem terapêutica com insulina.<sup>35</sup>

O defeito na proteína CFTR provoca uma diminuição da concentração de bicarbonato na secreção pancreática e consequente diminuição do conteúdo de água com redução da fluidez e volume da secreção. Desta forma, o aumento da viscosidade dessa secreção e a sua acumulação nos ductos pancreáticos conduz à lesão tecidual por meio da ativação das enzimas pancreáticas proteolíticas levando à inflamação crônica e fibrose.<sup>33-34,37</sup>

A primeira manifestação da insuficiência pancreática é o íleo meconial (obstrução do íleo terminal por um mecônio espesso) que se observa em 15-20% dos bebês.<sup>37</sup>

### 1.5.3. Doença Hepática

As manifestações hepatobiliares relacionadas com a Fibrose Cística têm-se tornado um desafio diagnóstico e terapêutico com o aumento da taxa de sobrevivência dos doentes.<sup>37</sup> No entanto, ao contrário do que acontece nas doenças pulmonar e pancreática, as quais afetam 90% dos doentes, a doença hepática apenas se desenvolve em 1/3 dos doentes.<sup>34</sup> A doença hepatobiliar, normalmente, aparece nos primeiros dez anos de vida dos doentes.<sup>34</sup> As manifestações da FC no sistema hepatobiliar estão diretamente relacionadas com a expressão da proteína CFTR que está presente nas membranas apicais das células dos canalículos biliares.<sup>33-34,38</sup> A doença hepática é caracterizada pelo bloqueio dos ductos biliares intra-hepáticos, uma vez que a bÍlis produzida por estes doentes é espessa e viscosa devido à dificuldade de transporte de água e eletrólitos causada pelo defeito na proteína CFTR.<sup>34,38</sup>

A lesão hepática típica da FC é a cirrose biliar, a qual resulta na obstrução dos ductos biliares<sup>34,37</sup> o que origina a libertação de moléculas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que induzem a síntese de colagénio levando a uma progressiva fibrose periportal.<sup>34,38</sup>

## **2. OBJETIVO**

---

O principal objetivo desta dissertação consistiu em explorar as novas estratégias terapêuticas para a Fibrose Cística. Pretendeu-se descrever as terapêuticas convencionais, atualmente disponíveis comercialmente, as quais tratam apenas os sintomas da Fibrose Cística, e compará-las com as novas abordagens terapêuticas que visam a causa principal da doença, incluindo quer as terapêuticas já disponíveis comercialmente quer as propostas em investigação. Foi dada especial atenção às terapêuticas usadas na doença pulmonar característica da Fibrose Cística. Uma vez que a causa da Fibrose Cística consiste numa alteração genética da proteína CFTR, o objetivo da pesquisa focou-se, essencialmente, na terapêutica genética e na terapêutica moduladora da CFTR.



### **3. METODOLOGIA**

---

A elaboração desta dissertação foi baseada numa revisão da literatura. Foi realizada pesquisa nas bases de dados PubMed, Medline, ISI Web of Knowledge e ScienceDirect, utilizando os seguintes termos descritivos: “*Cystic Fibrosis*”, “*Pulmonar disease in Cystic Fibrosis*”, “*Cystic Fibrosis Treatment*”, “*Alternative Therapies*”, “*Cystic Fibrosis Gene Therapy*”, “*Cationic Liposomes and Cystic Fibrosis*”, “*Cystic Fibrosis Future Perspectives*”, “*CFTR modulators*”, “*Ivacaftor*”, “*Kalydeco*”.

As referências bibliográficas utilizadas têm como base, na sua grande maioria, estudos experimentais ou observacionais.

#### **4. TERAPÊUTICA DA FIBROSE CÍSTICA**

---

##### 4.1. Aspectos Gerais

A doença, descrita em 1938 por *Andersen*, pela primeira vez como entidade patológica,<sup>1,2,14</sup> tinha há cerca de 70 anos atrás, um prognóstico considerado “quase fatal” no primeiro ano de vida. No entanto, ao longo das décadas, com o avanço do conhecimento sobre a fisiopatologia da FC e sobretudo sobre as suas formas de tratamento, a sobrevivência dos doentes foi-se tornando cada vez maior, o que fez com que a FC se tornasse também uma doença do adulto.<sup>39</sup> A prática dos cuidados melhorados no tratamento desta doença tem implicado o envolvimento de uma equipa multidisciplinar consistente, bem formada e treinada para a sua atividade.<sup>40-41</sup> Apesar de se tratar de uma doença multissistémica, a doença pulmonar, associada à FC, é progressiva e constitui o principal determinante prognóstico da doença,<sup>29</sup> o que implica que o papel do pneumologista seja fundamental nesta equipa multidisciplinar de tratamento.<sup>40</sup>

Tem-se revelado, como aspeto essencial no tratamento da FC, esclarecer claramente os doentes e as suas famílias no entendimento da doença e otimizar as intervenções no tratamento, sendo os pais os responsáveis por grande parte do tratamento de uma criança com FC.<sup>29</sup> Para além disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Associação Internacional de Fibrose Cística recomendam a implantação de centros especializados, visto que o tratamento nesses locais traz vantagens na qualidade de vida e longevidade,<sup>42</sup> principalmente no que diz respeito ao controlo da doença pulmonar e tratamento relacionado com a nutrição.<sup>41</sup>

Têm sido descritos, por vários autores, como princípios básicos no tratamento da FC: o controlo e tratamento das infeções pulmonares, aplicação de medidas no alívio da obstrução brônquica, tratamento da insuficiência pancreática, correlação do défice nutricional, bem como o tratamento de problemas físicos e psicossomais resultantes da doença.<sup>43-45</sup>

## 4.2. Terapêutica da Doença Pulmonar

### 4.2.1. Terapêutica da Infecção

A gravidade da fibrose cística varia muito de doente para doente, independentemente da idade. Essa gravidade é determinada, fundamentalmente, pelo grau de comprometimento pulmonar e, embora o curso da doença pulmonar seja invariavelmente o de uma deterioração progressiva,<sup>46-47</sup> uma abordagem terapêutica adequada tem mostrado retardar os danos pulmonares.<sup>39</sup>

O principal objetivo do tratamento do aparelho respiratório é a desobstrução das vias respiratórias, no sentido de garantir a respiração e a prevenção de infecções.<sup>39,47-48</sup> Os doentes com FC apresentam uma pré-disposição para a colonização e infecção dos brônquios por bactérias específicas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e outras como: *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Achromobacter* e vírus,<sup>39,49</sup> sendo a *Pseudomonas aeruginosa* o agente patogénico isolado com maior frequência na população adulta de doentes com FC.<sup>38,45</sup> O perfil terapêutico padrão para a doença pulmonar inclui agentes anti-inflamatórios, antibioterapia, agentes mucolíticos e broncodilatadores, suplementação de oxigénio e suporte nutricional.<sup>29,39-40</sup>

A antibioterapia é a pedra fundamental do tratamento da doença pulmonar na FC. Os doentes deverão ser avaliados, por rotina, a cada 4 meses, relativamente ao tipo de microrganismos e antibiograma da sua expectoração, de forma a poder fazer-se uma escolha adequada do antibiótico a administrar aos doentes.<sup>39</sup> Uma vez que a *Pseudomonas aeruginosa* é o agente patogénico mais comum, a escolha dos antibióticos para um caso de exacerbação aguda são, normalmente, direcionados para a erradicação desta bactéria.<sup>39,46</sup> Assim, geralmente, no caso de exacerbações mais graves (por exemplo, no caso dos doentes internados), o tratamento baseia-se numa associação de  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporina ou carbapenémicos) com aminoglicosídeos.<sup>39,48</sup> Esta associação de dois fármacos anti *Pseudomonas aeruginosa* é justificada pelo sinergismo e diminuição do surgimento de resistência da bactéria à terapêutica.<sup>39,46,48</sup> Nas exacerbações leves (normalmente em doentes de ambulatório) o tratamento utilizado consiste na administração de quinolonas (ciprofloxacina, como fármaco de escolha) combinada com um antibiótico inalatório, por exemplo, a polimixina E (Colistina), durante um período de 3 a 6 semanas.<sup>39,48</sup> Nos doentes com recidivas, é sugerido

um período de tratamento de 3 meses. O uso de tobramicina (antibiótico aminoglicosídeo) por via inalatória durante 4 semanas, seguindo-se um período de 4 semanas sem administração do fármaco, e assim sucessivamente, revelou estabilizar o quadro pulmonar, no caso de colonização crónica pela *Pseudomonas aeruginosa* e diminui a necessidade de administração de antibióticos por via intravenosa.<sup>39,46,48</sup> O Comité de Terapêuticas Pulmonares da Fundação de FC recomenda o uso, a longo prazo, de tobramicina inalada para melhorar a função pulmonar e diminuir as exacerbações nos doentes com FC, com idade igual ou superior a 6 anos, que apresentem doença pulmonar moderada a grave (moderada, FEV1-volume expiratório forçado no 1º segundo entre 40% a 69% do valor normal; grave FEV1 < 40% do valor normal) e a presença persistente de *P. aeruginosa* na cultura das vias respiratórias.<sup>50</sup> Um estudo conduzido por Ramsey *et al*<sup>51</sup> demonstrou que os doentes com idade superior a 6 anos, tratados com tobramicina inalada (3 ciclos de 300 mg administrados 2 vezes por dia durante 4 semanas, alternadas com 4 semanas sem administração do fármaco) experimentaram um aumento médio no FEV1 de 10% na semana 20 comparado com um declínio de 2% nos doentes tratados com placebo (p<0,001). Para além disso, 26% dos doentes tratados com tobramicina apresentaram uma menor taxa de hospitalização do que os doentes tratados com placebo.<sup>51</sup>

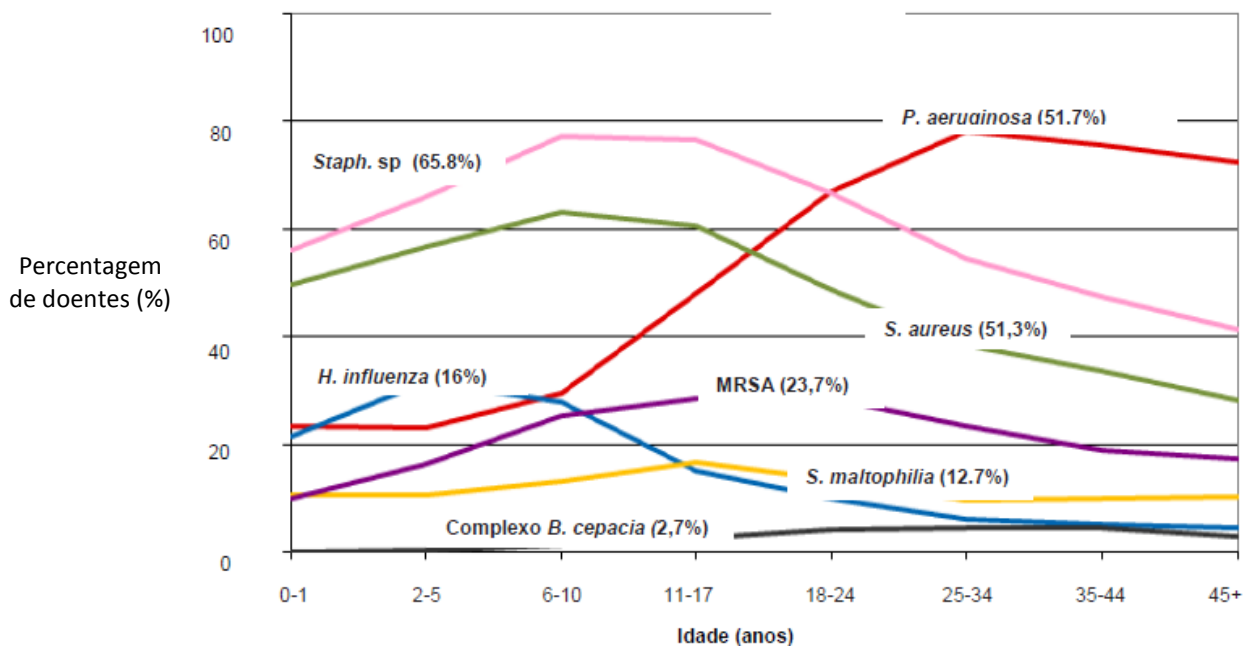
Um novo antibiótico inalado para a terapêutica da FC, o aztreonam (Cayston®), foi aprovado, em Fevereiro de 2010 pela *Food and Drug Administration* (FDA).<sup>52</sup> Trata-se do primeiro antibiótico inalado desenvolvido para a FC, durante mais de uma década.<sup>52</sup> O aztreonam, Cayston®; 75 mg administrado 3 vezes por dia durante 28 dias mostrou melhorar os sintomas respiratórios nos doentes com FC, com mais 7 anos de idade, e com infeção por *P. aeruginosa*.<sup>53</sup>

Os fármacos candidatos à terapêutica da FC que permanecem em atual desenvolvimento incluem uma nova preparação de tobramicina inalada, uma fluoroquinolona inalada, uma combinação de antibióticos inalados, e um novo aminoglicosídeo inalado. O pó para inalação TOBI® (TIP) é uma nova formulação de elevada potência de tobramicina, desenvolvida para libertar no pulmão quantidades deste aminoglicosídeo, que é farmacologicamente similar ao TOBI, mas com tempo de administração substancialmente mais curto. O TIP completou recentemente os estudos de fase III, e foi aprovado pela União Europeia. Os estudos de fase IV do TIP estão a decorrer nos Estados Unidos e na Europa. Uma preparação líquida inalada de uma fluoroquinolona, levofloxacina (Aeroquina®), encontra-se atualmente nos ensaios de

fase III e mostra-se como tratamento promissor. Os ensaios de fase II revelaram uma melhoria de 8,7% no FEV1 e um decréscimo de, aproximadamente, 1-log na densidade da *Pseudomonas aeruginosa* comparado com o placebo após 28 dias de administração de 240 mg por inalação.<sup>54</sup>

Duas outras preparações de antibióticos administradas por via inalatória, cada uma usando um aminoglicosídeo, estão também em desenvolvimento. O Arikace® é uma preparação de amicacina lipossomal, que proporciona uma libertação prolongada e um tempo de entrega rápido.<sup>55</sup> O Arikace® já completou os ensaios de fase II<sup>55</sup>, revelando uma melhoria relativa no FEV1 de 10,8% após 7 dias de tratamento com 500 mg inalados por dia, e os ensaios de fase III, deverão recrutar indivíduos com FC e *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>54</sup>

Uma combinação do antibiótico fosfomicina com tobramicina também completou os ensaios de fase II e mostrou-se promissora como a primeira combinação inalada de antibióticos, estando a ser investigada na FC. Uma característica única da combinação da fosfomicina/tobramicina inalada é o seu largo espectro, o que visto através da constante mudança microbiológica dos agentes da FC (Fig. 4.1), poderá constituir um benefício para os doentes afetados por vários organismos infecciosos.<sup>54</sup>



**Figura 4.1** – Distribuição de espécies bacterianas na FC por idade dos doentes. Adaptado de 56.

##### 4.2.2. Terapêutica Anti-inflamatória

No que diz respeito ao tratamento da doença pulmonar através do uso de anti-inflamatórios, têm sido realizados ensaios clínicos com potenciais fármacos anti-inflamatórios que possam deter a progressão do processo fisiopatológico na FC.<sup>39,47</sup> Os resultados de ensaios anteriores, usando três medicamentos: corticosteróides sistêmicos, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e azitromicina (antibiótico macrólido), têm liderado este campo de pesquisa.<sup>47</sup>

O tratamento com corticosteróides orais, numa dose de 1-2 mg/kg em dias alternados, evidenciou retardar a progressão da doença pulmonar,<sup>39,47</sup> apesar dos benefícios serem contrabalançados pelos riscos que estão associados ao seu uso.<sup>39</sup> Os trabalhos que têm sido conduzidos a nível de investigação carecem de evidências para o uso de corticosteróides sistêmicos nas exacerbações<sup>39,46</sup>, bem como para o uso de corticosteróides inalatórios,<sup>39</sup> sendo o estudo do tratamento inalatório com corticosteróides um tópico de grande interesse nos últimos anos.<sup>47</sup> Esta terapêutica continua a ser prescrita a um grande número de doentes, geralmente, devido à elevada relação entre a incidência de sintomas semelhantes aos da asma em doentes com FC,<sup>46-47</sup> apesar das evidências serem insuficientes para estabelecer se existe benefício no seu uso.<sup>39,47</sup>

De forma a identificar um fármaco anti-inflamatório que pudesse ser bem tolerado, *Konstan et al* iniciaram um estudo com o uso de uma elevada dose de ibuprofeno em modelos animais, e então foram desenvolvidos ensaios clínicos em doentes com FC.<sup>47</sup> Foram estudadas doses de ibuprofeno de 20 a 30 mg/kg por dia em doentes com FC.<sup>39,47</sup> O tratamento com estas doses de anti-inflamatório, evidenciou uma redução nas hospitalizações e melhoria do estado nutricional dos doentes com FC.<sup>39</sup> O ibuprofeno foi o único fármaco AINE que demonstrou eficácia no tratamento da FC, com uma melhoria na velocidade de declínio no FEV1 num período superior a 2 anos (2 a 7 anos), uma vez que a redução de 29%, por ano, no FEV1, correspondeu a uma preservação de mais do que 1%, neste indicador, previsto em cada 2 anos.<sup>57</sup> Apesar de se ter observado um aumento dos sintomas associados à toxicidade dos anti-inflamatórios não-esteróides, incluindo: aumento da incidência de insuficiência renal, hemorragia gastrointestinal e dor abdominal,<sup>39,47</sup> o ibuprofeno é recomendado como terapêutica benéfica em doentes entre os 7 e os 18 anos,<sup>46</sup> visto que este fármaco apresentou um perfil de risco favorável.<sup>57</sup>



O desenvolvimento de terapêuticas anti-inflamatórias na FC tem sido um desafio porque o seu mecanismo de ação pode ser o de prevenir, a longo prazo, o declínio clínico, mais do que um efeito agudo nas medidas clínicas usadas de forma mais comum, tais como a função pulmonar ou a frequência das exacerbações pulmonares. Desta forma, a detecção dos benefícios clínicos requer estudos de longa duração e tamanho da amostra significativo, o que muitas vezes desencoraja o desenvolvimento de potenciais terapêuticas anti-inflamatórias nessa população.<sup>54</sup> Apesar destes desafios, várias terapêuticas anti-inflamatórias têm sido aprovadas nos ensaios de fase II, as quais estão registadas na Fundação da Fibrose Cística 2012. Três exemplos desses fármacos incluem a N-acetilcisteína, o ácido docosahexenoico e o sildenafil.<sup>54</sup>

A N-acetilcisteína (NAC) é um metabolito endógeno, que é frequentemente utilizado na FC, como um fluidificante do muco, através da quebra de pontes dissulfeto entre as moléculas de mucina. É um pró-fármaco da GSH (glutathione na forma reduzida), podendo melhorar o desequilíbrio da oxidação sistémica, causada pela malabsorção, pelo intestino, de oxidantes na dieta, verificada na FC.<sup>58</sup> Este antioxidante oral, administrado em elevadas doses (>1,8 g por dia) revelou, nos ensaios de fase II, um impacto nas medidas anti-inflamatórias em doentes com FC e inflamação de linha base, um efeito hipotético que ocorre por abordagem de um desequilíbrio redox nos neutrófilos.<sup>58</sup> Com base nestes resultados encorajadores, foi desenvolvido um ensaio clínico de fase IIb com NAC<sup>55</sup>, o qual demonstrou um efeito na função pulmonar, contudo o efeito na inflamação não foi reproduzido.<sup>59</sup> Do mesmo modo, a suplementação, a longo prazo (8 meses) com os ácidos docosahexaenoico e eicosapentanoico, ácidos gordos ómega 3, demonstrou atividade anti-inflamatória na FC num ensaio realizado em 2003 por *De Vizia* e seus colaboradores,<sup>60</sup> tendo completado os ensaios de fase II em crianças.<sup>55</sup> Os ensaios de fase II do sildenafil estão, atualmente, avaliando o efeito deste inibidor oral da fosfodiesterase nos marcadores da inflamação das vias respiratórias dos doentes com FC.<sup>55</sup>

Relativamente à azitromicina, por se tratar de um antibiótico que pertence à classe dos macrólidos, possui uma atividade anti-inflamatória. A azitromicina é, normalmente, prescrita como terapia para a FC, sendo recomendada em doentes colonizados, cronicamente, por *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>47,54</sup>

##### 4.2.3. Eliminação Mucociliar

A disfunção na proteína CFTR impede o transporte do íon cloreto no lúmen das vias respiratórias, o que leva à desidratação do revestimento líquido da superfície destas vias. O aumento da absorção transepitelial de sódio causada pela perda do efeito regulador da CFTR conduz ao mau funcionamento dos cílios, o que tem como consequência uma eliminação mucociliar reduzida. Ao mesmo tempo, a inflamação neutrofilica leva a que elevados níveis de ADN sejam libertados, a partir de leucócitos em degeneração, aumentando a viscosidade do muco. As terapêuticas atuais incluem soluções salinas hipertónicas, que possam garantir a hidratação das mucosas das vias respiratórias e o uso de dornase alfa, ou DNase recombinante humana (rhDNase) que cliva seletivamente o ADN existente na expectoração, diminuindo assim a viscosidade do muco,<sup>3,61</sup> fármaco este aprovado em 1994 para uso exclusivo na FC.<sup>3</sup>

Encontram-se, atualmente, em ensaios clínicos dois novos tratamentos efetivos na eliminação mucociliar: denufosol e manitol inalado.<sup>61</sup>

O tetrasódio de denufosol é um agonista do recetor de P2Y<sub>2</sub>, que estimula a secreção de cloreto, por ativação de canais de cloreto alternativos no epitélio das vias respiratórias. O denufosol, também é capaz de inibir a absorção do sódio, aumentar o batimento ciliar, além de aumentar a produção de surfactante pelos pneumócitos tipo II, o que resulta num aumento da hidratação da mucosa e melhor eliminação mucociliar.<sup>61</sup> Ensaios clínicos de fase II avaliaram o efeito de doses de 20 a 60 mg de denofusol administradas durante 28 dias, verificando-se um aumento de FEV<sub>1</sub> ( $\geq 75\%$  do que o esperado), relativamente ao placebo. O primeiro ensaio de fase III consistiu numa comparação do efeito de 60 mg de denufosol e placebo em 350 doentes com FC e com FEV<sub>1</sub>, no início do estudo, igual ou superior a 75% do previsto.<sup>62</sup>

O manitol inalado é um agente com ação osmótica que será utilizado como pó seco inalado. A sua ação manifesta-se pelo aumento de hidratação da mucosa das vias respiratórias, além de promover o aumento da eliminação mucociliar.<sup>61</sup> Um ensaio internacional de fase III, publicado em 2012, realizado para determinar a eficácia e segurança do manitol inalado, sugere que o uso regular desta substância aumenta a função pulmonar e reduz a frequência de exacerbações em doentes com FC.<sup>63</sup>

### 4.3. Terapêutica da Insuficiência Pancreática

A insuficiência pancreática é a manifestação gastrointestinal mais comum na FC e o seu tratamento deve ser mantido indefinidamente.<sup>64</sup>

A malabsorção intestinal na FC é multifatorial e a deficiência em enzimas pancreáticas é o fator predominante, o que tem como consequência a malabsorção dos nutrientes e comprometimento do estado nutricional.<sup>64</sup> Assim, a nutrição em doentes com FC, é focada nas limitações causadas pela doença pancreática.<sup>2</sup>

A terapia enzimática é o tratamento indicado para a insuficiência pancreática e tem como principais objetivos corrigir a má absorção de macro e micronutrientes, possibilitar a ingestão de dietas com conteúdo de gordura normal ou aumentado, manter um ganho de peso adequado com bom estado nutricional, proporcionar um trânsito intestinal normal, melhorar a consistência das fezes, reduzir a frequência de evacuações e minimizar os sintomas gastrointestinais.<sup>64-65</sup>

Estão disponíveis, comercialmente, vários tipos de enzimas, como por exemplo, preparações em pós, comprimidos, cápsulas com microsferas, encontrando-se na forma de dose padrão e em doses elevadas (>20000 UI de lipase).<sup>65</sup> As enzimas na forma de pó possuem a desvantagem de serem inativadas pelo ácido gástrico e serem pouco ativas no duodeno.<sup>42</sup>

As enzimas pancreáticas, usadas no tratamento, na forma de microsferas revestidas entericamente, dissolvem-se num pH entre 5.5 e 6.0, evitando a inativação pela acidez gástrica,<sup>42,65-66</sup> permitindo apenas a libertação das enzimas no intestino, onde o pH é propício para a sua atividade.<sup>2,66</sup> No que diz respeito à administração destas enzimas, a dose inicial é de 500 a 1500 UI de lipase/kg/refeição ou 400 a 4000 UI de lipase/g de gordura ingerida por dia, sendo a dose aumentada progressivamente de acordo com o controlo dos sintomas (ganho ponderal e observação da perda de gordura nas fezes) até ao máximo de 2500 UI de lipase/kg/refeição e 10000 UI/kg/dia<sup>39,64-65,67</sup> É recomendado que a administração das enzimas seja dividida em duas doses, sendo uma dose ingerida no início da refeição e a outra dose durante ou no fim da refeição.<sup>65</sup>

Uma vez que os doentes com insuficiência pancreática estão predispostos à má absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, a suplementação dessas vitaminas é recomendada por rotina.<sup>39</sup>

#### 4.4. Terapêuticas Alternativas – Terapêutica Antioxidante

Os radicais livres de oxigénio (RLO) são produzidos naturalmente pelo nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos.<sup>68</sup> Exemplos de RLO são oxigénio molecular ( $O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), anião superóxido ( $O_2^-$ ), radical peroxil ( $ROO^\cdot$ ), radical alcóxil ( $RO^\cdot$ ) e óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ).<sup>69</sup> O peróxido de hidrogénio não é um radical livre, contudo representa um metabolito do oxigénio parcialmente reduzido, pelo que é denominado como espécie reativa de oxigénio (ERO), em função da sua atividade aumentada para as biomoléculas.<sup>68</sup> Todos os radicais livres e demais moléculas que surgem em função das suas ações oxidativas nos sistemas biológicos são denominados EROs.<sup>69</sup> Estes radicais podem apresentar efeitos benéficos, se estiverem em baixa ou moderada concentração, constituindo uma defesa contra agentes infecciosos e desempenhando um papel importante na ativação de sistemas de sinalização celular. No entanto, quando existe uma produção exagerada de radicais livres e/ou uma deficiência nos mecanismos de proteção, químicos e enzimáticos, fundamentais para neutralizar esses radicais, fica-se na presença de uma situação de stress oxidativo. O termo stress oxidativo é usado em circunstâncias nas quais a disputa por radicais livres resulta num dano dos tecidos ou na produção de compostos tóxicos ou danosos para os tecidos. Assim, pode dizer-se que um sistema se encontra sob stress oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas prooxidantes e oxidantes, de modo a que os primeiros predominem sobre os segundos.<sup>68</sup> A peroxidação lipídica, que acontece nas membranas celulares, é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida por radicais livres, visto que praticamente todas as biomoléculas são susceptíveis à oxidação. Para se protegerem contra situações de oxidação, os organismos possuem, como descrito anteriormente, mecanismos químicos e enzimáticos de defesa. No que diz respeito aos mecanismos químicos, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, selénio, ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das EROs produzidas intra e extracelularmente. No que se refere aos mecanismos de defesa enzimáticos, quando são expostos às EROs, os organismos sintetizam enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase (GPX dependentes e não dependentes de selénio).<sup>69</sup> Apesar destas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROs, os organismos podem experimentar situações onde a proteção se mostra insuficiente, como é o caso de patologias em que há uma produção aumentada de EROs, por exemplo.

Na FC, a presença de uma CFTR não funcional parece produzir um desequilíbrio redox nas células epiteliais e fluidos extra-celulares e causar um aparecimento anormal de radicais livres de oxigénio.<sup>58,70</sup> O stress oxidativo pode ter um papel importante na fisiopatologia da FC. O pulmão, o principal órgão responsável pela morbidade e mortalidade nesta doença é particularmente vulnerável a elevados níveis de stress oxidativo. Está exposto a 8000 L de ar rico em oxigénio por dia, bem como a partículas tóxicas, dióxido de nitrogénio, ozono e outros oxidantes. Além disso, há internamente fontes de oxidantes, incluindo os processos metabólicos mitocondriais, ácidos gordos, reações com o citocromo P450, ativação fagocítica e o sistema da óxido nítrico sintase.<sup>71</sup> Os oxidantes são cruciais para a defesa do hospedeiro. O trato respiratório está protegido contra infeções por radicais livres de oxigénio gerados por células fagocíticas e epiteliais e a diminuição destes radicais pode originar infeções bacterianas crónicas. Embora os oxidantes das vias respiratórias forneçam muitos benefícios, um excesso de oxidantes pode causar danos biomoleculares que poderão desempenhar um papel importante em várias doenças pulmonares, incluindo a FC. O ambiente redutor encontrado nas células pulmonares saudáveis impede a geração de uma resposta inflamatória exagerada aos “stresses” inalados. Um ambiente oxidativo, por sua vez, influencia vários eventos de sinalização intracelular, o que conduz à apoptose, aumento da síntese e secreção de muco, alteração do transporte de iões, incluindo a secreção de cloreto. O resultado é uma cascata de inflamação excessiva, libertação de mediadores e eventos de lesão tecidual que caracterizam a doença pulmonar na FC. Com início na infância, os indivíduos com FC são atormentados por inflamação das vias respiratórias. Um elevado número de neutrófilos ativados migram para o interior das vias respiratórias para atacarem as bactérias invasoras e têm o potencial de libertar para o seu microambiente grandes quantidades de oxidantes, incluindo o anião superóxido, peróxido de hidrogénio e ácido hipocloroso. Bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* que, cronicamente, infeta as vias respiratórias na FC, também geram radicais livres de oxigénio através da libertação de piocianina e outros pigmentos fenazina. Consequentemente, as vias respiratórias na FC são expostas, não só aos ambientes normais de oxidantes, mas também aos oxidantes derivados de processos inflamatórios e doenças infecciosas, causando um saldo positivo de excesso de oxidação, tal como demonstrado pelos marcadores oxidativos lipídicos e proteicos encontrados nos indivíduos com FC.<sup>71</sup>

As vias respiratórias normais são capazes de lidar com o stress oxidativo através de uma variedade de mecanismos, incluindo a absorção e/ou biossíntese de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Maiores níveis de antioxidantes no plasma ou na dieta têm sido associados a uma melhoria da função pulmonar, como demonstrado por um maior nível e menor velocidade de declínio do volume expiratório forçado no 1º segundo (FEV1) e um declínio no risco de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).<sup>71</sup>

Os antioxidantes não enzimáticos em maior quantidade presentes na superfície do trato respiratório incluem ascorbato, urato,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutathiona reduzida (GSH), mucinas e albumina. As proteínas metal-ligando como a lactoferrina, transferrina e ceruplasmina também, previsivelmente, funcionam como antioxidantes intralumenais das vias respiratórias. As concentrações de antioxidantes que estão disponíveis no meio extracelular variam muito de localização. No pulmão normal, a GSH e o ascorbato, por exemplo, estão presentes em concentrações bastante elevadas no lavado broncoalveolar, mas nas vias aéreas respiratórias, onde a FC seria proeminente, as concentrações são mais baixas e a mucina pode representar o principal antioxidante. Os antioxidantes que estão presentes no fluido da superfície normal das vias respiratórias também são encontrados no fluido das vias respiratórias com FC, embora os níveis estejam, por vezes, alterados.<sup>71</sup> De forma a entender como é que estes numerosos sistemas antioxidantes podem ser alterados na FC, é importante examinar as principais defesas antioxidantes do hospedeiro, que se encontram implantadas nas vias respiratórias. A mucina é uma das proteínas mais abundantes da expectoração, trata-se de um antioxidante e um importante determinante da viscosidade do muco. As propriedades antioxidantes da mucina devem-se ao seu elevado número de resíduos de cisteína e cistina altamente recativos e às propriedades antioxidantes dos seus carboidratos. O stress oxidativo aumenta a expressão genética da mucina e a sua secreção, resultando num aumento dos níveis de antioxidantes nas superfícies do trato respiratório. A viscosidade da mucina é regulada pelo movimento da água, bicarbonato e glutathiona, os quais são influenciados pela CFTR. Um decréscimo em qualquer um destes fatores, o que acontece após a perda da função da CFTR, aumentam a viscosidade da mucina. O muco mais grosso e viscoso na superfície epitelial das vias respiratórias fornece uma barreira antioxidante, embora a eliminação mucociliar seja mutuamente comprometido. Os níveis de mucina na expectoração dos doentes com FC podem atingir uma concentração de 40 mg/g e podem representar muito do potencial antioxidante das vias respiratórias na FC. Contudo, mucina em excesso, pode ser contra produtiva para a saúde

das vias respiratórias; a mucina respiratória protege das bactérias patogênicas como a *Pseudomonas aeruginosa* a partir da morte mediada dos neutrófilos. A inibição da síntese de mucina tem sido descrita como uma potencial estratégia terapêutica na FC.<sup>71</sup>

A GSH, um tripéptido, é o principal composto de tiol de baixo peso molecular e desempenha vários papéis. Nas células pulmonares, as funções da GSH são de antioxidante em combinação com GSHPx ou peroxiredoxina. O dissulfureto de glutathione resultante (GSSG) ou é rapidamente reduzido pela glutathione redutase e o NADPH ou utilizado no processo de *folding* da proteína do retículo endoplasmático. Aqui a GSSG é reciclada pela proteína dissulfureto isomerase para formar GSH. Devido a estes mecanismos de reciclagem, a GSH é um tampão intracelular extremamente eficiente para o combate ao stress oxidativo.<sup>71</sup>

Um defeito considerável no metabolismo da GSH associado a uma reduzida ingestão e absorção de vitaminas antioxidantes lipo-solúveis (vitamina E e carotenoides que estimulam a atividade da GSHPx) pode contribuir para uma proteção antioxidante não efetiva,<sup>70,72</sup> o que se acredita exacerbar os índices de stress oxidativo juntamente com a progressão do estado clínico. O desenvolvimento de lesões inflamatórias e degenerativas nos tecidos alvo, como o pulmão, pâncreas e fígado vai agravar ainda mais a alteração de um fluxo normal para um fluxo anormal de radicais livres de oxigénio em vários órgãos, levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento de stress oxidativo sistémico. Sob este ponto de vista, assume-se que os doentes com FC, necessitem de uma demanda antioxidante mais elevada.<sup>70</sup>

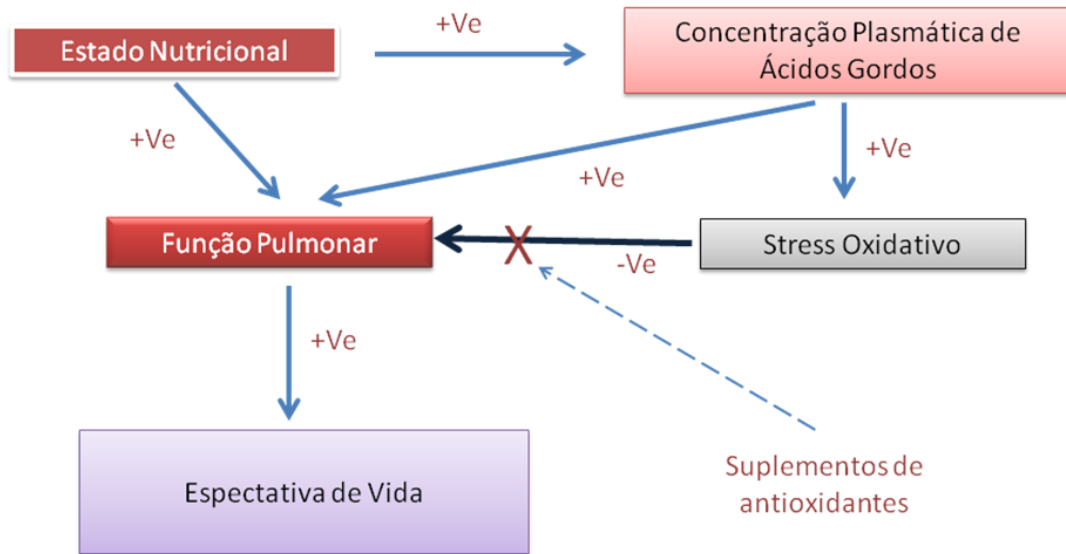
As estratégias da terapia com antioxidantes na FC têm como principal objetivo restaurar o balanço oxidante-antioxidante das vias respiratórias, o qual se encontra alterado devido à infeção crónica e ativação celular inflamatória. Alguns ensaios observacionais confirmaram que os antioxidantes usados como suplementos alimentares ou fármacos para administração pulmonar através de formulações de aerossóis, podem ajudar a aliviar os danos progressivos do pulmão e outros eventos clínicos adversos da FC como o crescimento anormal.<sup>70</sup>

Wood *et al*,<sup>72</sup> realizaram o primeiro ensaio clínico randomizado duplamente cego e controlado em doentes com FC no qual foi avaliado o efeito da suplementação antioxidante nas concentrações de isoprostano. Os isoprostanos são considerados os biomarcadores mais precisos e confiáveis de stress oxidativo, porque são estruturalmente estáveis, são produzidos *in vivo*, e estão presentes em concentrações relativamente elevadas. Os investigadores descreveram que, embora as defesas antioxidantes aumentem com a administração de

elevadas doses de antioxidantes, não existe correspondência com a diminuição do stress oxidativo (avaliado pelas concentrações de 8-*iso*-PGF<sub>2α</sub>). As concentrações de ácidos gordos no plasma mostraram ter uma maior influência nas concentrações plasmáticas de 8-*iso*-PGF<sub>2α</sub>, sugerindo que uma elevada ingestão de ácidos gordos contribui para o stress oxidativo. Contudo, a existência de uma correlação entre as concentrações aumentadas de ácidos gordos no plasma e o aumento da função pulmonar sugere que dietas ricas em ácidos gordos apresentam benefícios clínicos para os doentes com FC. Também se verificou que o aumento da concentração plasmática de antioxidantes ( $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A e selénio, um composto essencial de enzimas como a GSHPxs) tem uma relação direta com o aumento da função pulmonar. Consequentemente, as dietas ricas em antioxidantes e ácidos gordos podem ter relevância clínica nos doentes com FC.<sup>72</sup>

A figura 4.2 mostra que um aumento na concentração de ácidos gordos está relacionado tanto com o aumento do stress oxidativo como com a melhoria da função pulmonar, ou seja, os benefícios clínicos ganhos a partir de uma dieta rica em ácidos gordos prevalecem sobre qualquer efeito negativo da oxidação, resultando numa melhoria da função pulmonar. Estes resultados levaram os autores a questionar a importância do stress oxidativo na FC. A FC é uma doença multifatorial e são muitas as variáveis que levam aos danos do pulmão, como a infeção, a eliminação mucociliar reduzida e a gravidade da mutação genética. O curto prazo de suplementação do ensaio não forneceu qualquer evidência direta de que o stress oxidativo pudesse contribuir para a deterioração do pulmão.<sup>72</sup>





**Figura 4.2** – Modelo que descreve a relação entre o stress oxidativo, o estado nutricional, os antioxidantes e o estado clínico na fibrose cística. +Ve, efeito positivo e –Ve, efeito negativo Adaptado de 72.

Até agora, poucos estudos têm examinado com suficiente rigor metodológico a eficácia clínica da terapêutica antioxidante na FC. A informação útil neste campo foi retirada de quatro ensaios clínicos randomizados controlados e de um estudo quase randomizado controlado com vitaminas C, E,  $\beta$ -caroteno e selênio usados como suplementos administrados sozinhos ou em associação. Apenas três ensaios (87 participantes) apresentaram dados adequados para a análise, dois ensaios revelaram ausência de qualquer melhoria significativa na função pulmonar, que foi escolhida como resultado primário, conjuntamente com a qualidade de vida que aumentou num ensaio. Os resultados secundários relativamente aos índices laboratoriais de stress oxidativo e estado antioxidante mostraram grandes melhorias. Estas melhorias incluíram o aumento SeGPx nos eritrócitos (RBC) devido ao suplemento de selênio administrado individualmente ou combinado com outros suplementos, e aumentou os níveis de todos os antioxidantes plasmáticos, exceto da vitamina C, o que foi observado em todos os ensaios.<sup>70,73</sup> A mensagem retirada, a partir destes estudos, para pediatras e nutricionistas dentro do corpo clínico de centros de FC é que, na ausência de provas sólidas sobre a eficácia clínica de formulações orais de suplementos antioxidantes em doentes com CF, o seu uso como uma prática clínica de rotina deve ser considerada com a devida cautela, tendo claro em mente que este deve representar apenas um complemento de uma das mais

críticas intervenções no programa de manutenção de qualidade de vida dos doentes com FC, como por exemplo, fornecer uma nutrição adequada.<sup>70</sup>

Ainda no que diz respeito às tentativas de melhorar o estado de desequilíbrio da oxidação sistémica que é observado nos doentes portadores da mutação na CFTR, *Tirouvanziam et al.*,<sup>58</sup> realizaram um estudo acerca do efeito de um pró-fármaco da GSH (o antioxidante celular mais abundante) no processo inflamatório, característico da FC. Tendo em conta que os neutrófilos de doentes com FC apresentam deficiência no antioxidante GSH, partiu-se do pressuposto que um fármaco que aumentasse os níveis deste antioxidante poderia ser útil. O estudo consistiu na administração, num total de 27 crianças, 9 controlos e 18 com FC, de doses elevadas de N-acetilcisteína (0.6; 0.8 e 1.0 g por dia, 3 vezes ao dia durante 4 semanas), um metabolito endógeno intermediário, que é frequentemente utilizado na FC, como fluidificante do muco, e é um pró-fármaco da GSH, o que poderá contribuir para melhorar o desequilíbrio oxidativo. Os investigadores verificaram que a adesão ao tratamento foi elevada ( $93 \pm 1\%$ ), sem ocorrência de efeitos adversos identificados clinicamente, em testes laboratoriais e nos questionários relativos à qualidade de vida. A eficácia do tratamento, com elevadas doses de N-acetilcisteína, foi demonstrada pelo aumento significativo dos níveis de GSH nos neutrófilos e eritrócitos, não havendo diferença estatística entre as 3 doses usadas, para além da diminuição de recrutamento de neutrófilos para o pulmão. Assim, a N-acetilcisteína mostrou ser segura em elevadas doses (600 mg), podendo ser utilizada na FC junto a outros medicamentos, como os antibióticos. Apesar da função pulmonar não ter apresentado melhorias significativas, neste estudo, a diminuição da atividade da elastase observada, o melhor indicador da função pulmonar, oferece esperanças de que o tratamento a longo prazo (superior a 4 semanas) possa ajudar a diminuir o ritmo do declínio da função pulmonar, característico dos doentes com FC.<sup>58</sup>

Tendo em conta o que já foi descrito anteriormente, nomeadamente que os níveis de vários antioxidantes nos fluídos extracelulares se encontram significativamente diminuídos no indivíduo com doença pulmonar na FC, parece possível que ao restaurar esses níveis de antioxidantes, restaurando o equilíbrio redox, se poderiam modular processos inflamatórios e, consequentemente, reduzir o stress oxidativo relacionado com a inflamação.

Neste sentido, a suplementação com as vitaminas A e E, no sentido de normalizar os níveis séricos, deverá fazer parte da rotina dos indivíduos com FC. Estes antioxidantes lipossolúveis,

que apresentam elevados efeitos de proteção das células broncoepiteliais, estão na maioria dos casos bastante diminuídos no plasma dos indivíduos com FC. A relação descrita entre os níveis plasmáticos e a melhoria do estado clínico para outros lípidos solúveis antioxidantes é preliminar, mas uma vez que as evidências sugerem que a suplementação pode ser benéfica, os ensaios clínicos cuidadosamente controlados deverão constituir uma prioridade dentro dos ensaios futuros, com antioxidantes, na FC.<sup>71</sup> Assim, recomenda-se que os estudos futuros usando antioxidantes em associação ou suplementos de antioxidantes individuais, incluam medidas de biomarcadores da inflamação e de stress oxidativo, bem como medidas de resultados clinicamente relevantes.<sup>71</sup>

A administração pulmonar de antioxidantes por meio de formulações de aerossóis apresenta-se como campo promissor na investigação clínica da FC. Deverão, no entanto, ser colocadas várias questões para entender o potencial da terapêutica antioxidante sistêmica ou com aerossóis na FC. Os problemas de toxicidade, são atualmente, a principal preocupação e tema de avaliação clínica por vários grupos, uma vez que os níveis adequados de ingestão de micronutrientes antioxidantes são diferentes entre os doentes com FC e os indivíduos saudáveis, variando igualmente de acordo com a idade dos doentes e muitos outros fatores, como por exemplo, o nível individual de deficiência em micronutrientes antioxidantes.<sup>70</sup>

## **5. NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS**

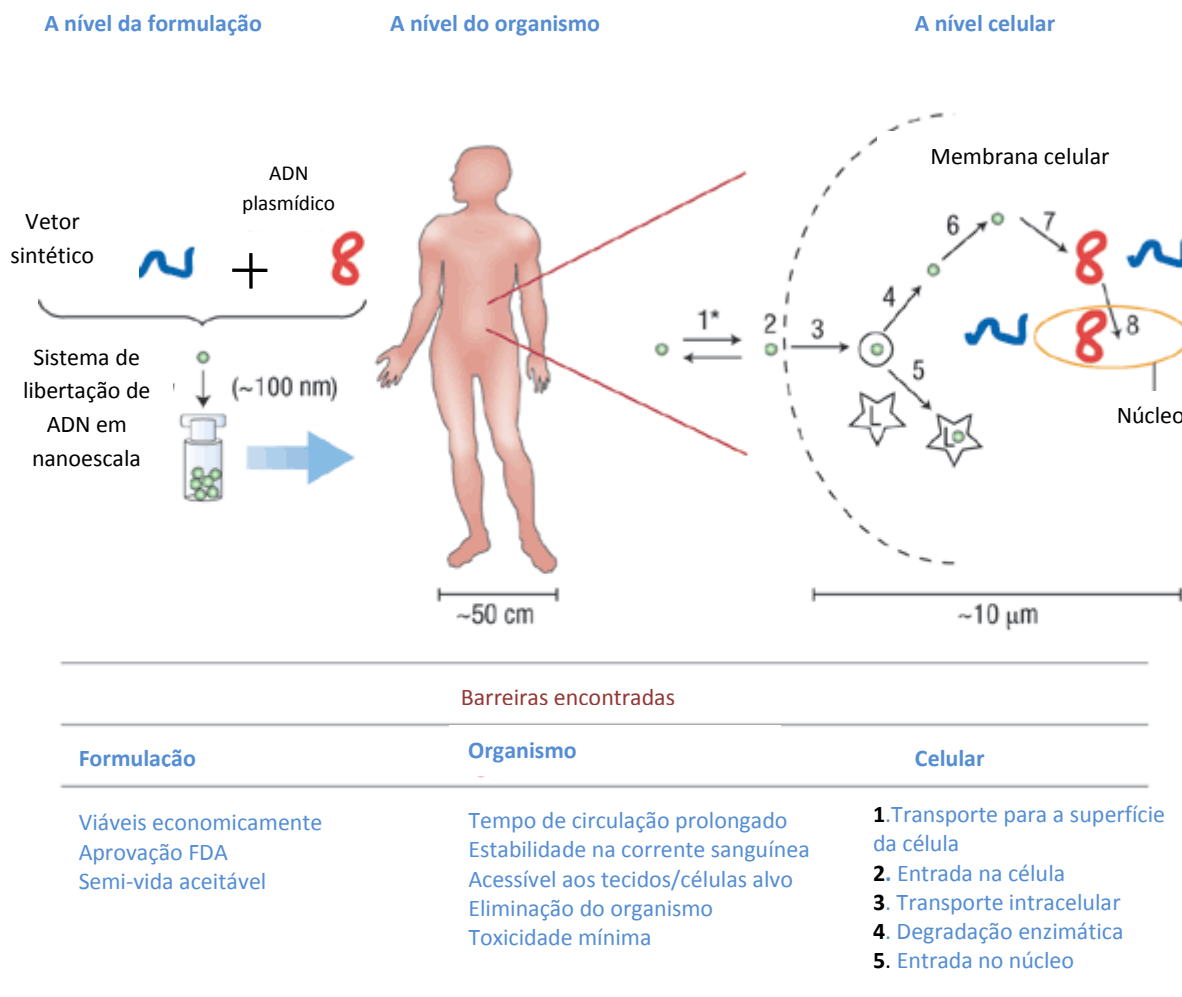
---

### 5.1. Terapêutica Genética

As terapêuticas atualmente disponíveis, desde os antibióticos inaláveis, anti-inflamatórios sistêmicos, mucolíticos, têm revelado aumentar a qualidade e expectativa de vida, no entanto, estes fármacos não tratam o defeito básico causador da FC, isto é, a ausência de CFTR funcional.<sup>1</sup> Assim, surgem, ao longo dos tempos, as estratégias terapêuticas modificadores da doença, que podem ser classificadas em dois grupos principais: agentes que têm como alvo a mutação genética (terapêutica genética) e as novas abordagens que têm como objetivo tratar a proteína associada ao defeito genético, tais como moléculas moduladoras da CFTR.<sup>74</sup>

A FC é uma excelente doença candidata à terapia genética, uma vez que já se verificou que pequenas quantidades de CFTR funcional (aproximadamente 10% dos níveis totais normais da proteína) são suficientes para prevenir a doença pulmonar.<sup>2</sup> Apenas uma pequena porção de células no epitélio das mucosas necessita expressar a CFTR para que ocorra correção total das propriedades do transporte de cloro.<sup>2</sup> A fibrose cística é considerada doença candidata ideal para a terapêutica genética por outros motivos. Para além de advir de um defeito genético recessivo, a principal patologia associada é a do pulmão, órgão acessível sem necessidade de tratamentos invasivos. A estas características adiciona-se o fato de ser uma doença progressiva, com um fenótipo praticamente normal no nascimento, o que permite uma janela terapêutica, desde o nascimento até que o doente atinja o estado moderado a grave da doença.<sup>8</sup>

A terapêutica genética implica a inclusão celular de genes inexistentes ou ainda a correção de genes modificados através da inserção da sequência genética inalterável.<sup>75-76</sup> Apesar destas novas terapêuticas poderem constituir uma promissora modalidade na prática médica para o tratamento de doenças como a FC (doenças resultantes de alterações moleculares dos ácidos nucleicos), a sua eficácia é limitada pela reduzida penetração celular de moléculas de ARN e/ou ADN (Fig. 5.1), por serem moléculas polianiónicas e por apresentarem instabilidade nos líquidos celulares.<sup>75,77</sup> Por estes motivos, para que estas terapêuticas possam ser eficazes, surge a necessidade do desenvolvimento de um sistema efetivo de libertação de moléculas de ARN e/ou ADN e dos seus fragmentos no interior das células.<sup>75,77</sup>



**Figura 5.1** – Barreiras fisiológicas e não fisiológicas para entrada de ácidos nucleicos nas células. Adaptado de 78.

O sistema de libertação de material genético para uso terapêutico a partir de partículas semelhantes a vírus recebeu uma atenção considerável.<sup>79</sup> A evolução molecular dos vírus produziu organismos de eficiência incomparável para transportar e libertar material genético.<sup>79</sup> A utilização de vírus destruídos (por exemplo, retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados), que não possuem propriedades virulentas nem capacidade replicativa parecia ser o método mais eficaz de libertação de material genético até um doente de um ensaio clínico ter morrido quatro dias após receber a terapêutica adenoviral para o tratamento da deficiência da enzima ornitina transcarbamilase.<sup>79</sup> A pressão negativa que esta situação gerou, juntamente com outras desvantagens da terapêutica de genes virais, como a ocorrência

de resposta imunitária, possibilidade de ativação de proto-oncogene, os custos de produção e limitações de tamanho do gene a libertar, exigiram a criação de estratégias alternativas de terapêutica genética.<sup>79</sup>

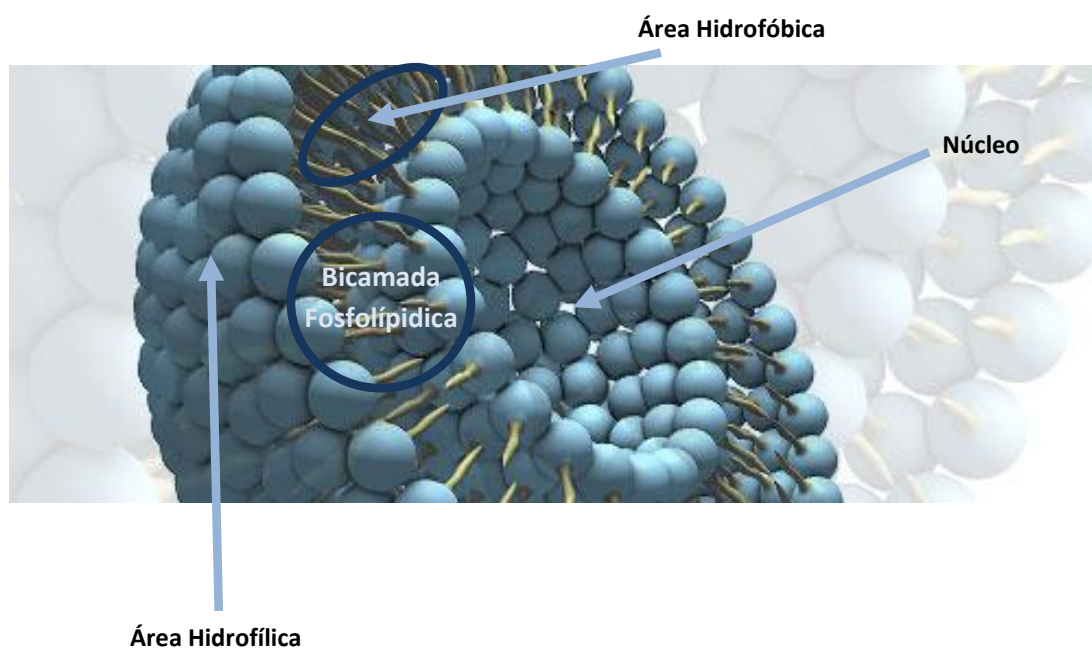
Os sistemas de libertação constituídos por vetores não-virais baseiam-se no uso de espécies catiónicas.<sup>80-81</sup> Estas têm a capacidade de complexar os genes que, por sua vez, são carregados negativamente. Assim, os genes são protegidos contra a degradação por DNAses, sendo compactados para penetrar no interior da célula via endocitose.<sup>80,82</sup>

Os sistemas não virais que têm sido estudados incluem emulsões lipídicas catiónicas, dendrímeros, moléculas de ADN conjugadas com lípidos, hidratos de carbono, proteínas ou outros agentes sintéticos (partículas poliméricas) e lipossomas catiónicos.<sup>83</sup>

Os ensaios clínicos realizados no âmbito da FC utilizaram, dentro das espécies catiónicas, os lipossomas, os quais serão discutidos na secção seguinte.

### 5.1.1. Abordagem Lipossomal

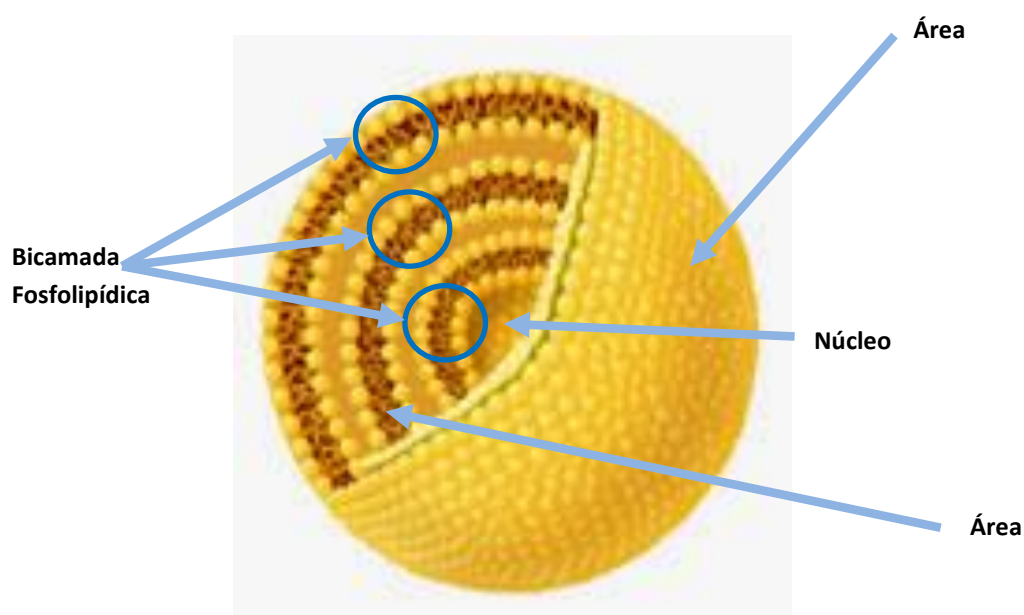
Os lipossomas foram descobertos em 1961 pelo cientista inglês *Alec Bangham*,<sup>84-85</sup> são vesículas esféricas artificiais de tamanho variável (20 nm a cerca de 1  $\mu$ m de diâmetro), os quais podem ser produzidos a partir de fosfolípidos naturais e colesterol.<sup>85</sup> Geralmente, os lipossomas podem ser classificados como unilamelares (Fig. 5.2) ou multilamelares (Fig. 5.3). Os lipossomas unilamelares são divididos em lipossomas de tamanho pequeno (SUV, 50-100 nm) ou lipossomas de tamanho grande (LUV, 100-250 nm).



**Figura 5.2** - Estrutura de lipossoma unilamelar. *Adptado de 87.*

Os lipossomas unilamelares, SUVs e LUVs, são ambos compostos por uma bicamada fosfolípida e um grande interior aquoso, permitindo, consequentemente, o carregamento de fármacos hidrofílicos; enquanto os lipossomas multilamelares (MLV), normalmente com um diâmetro de 1-5  $\mu$ m, são compostos por várias bicamadas lipídicas e um espaço interior aquoso limitado, adequados, consequentemente, ao transporte de fármacos hidrofóbicos.<sup>86</sup>

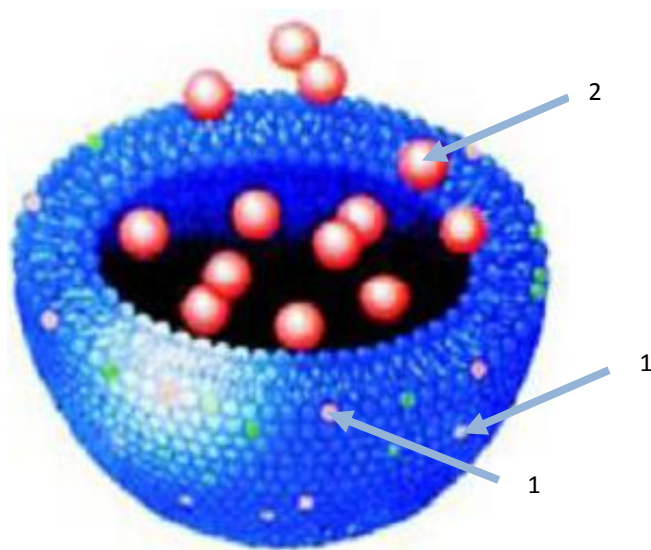




**Figura 5.3** - Estrutura de lipossoma multilamelar. *Adaptado de 87.*

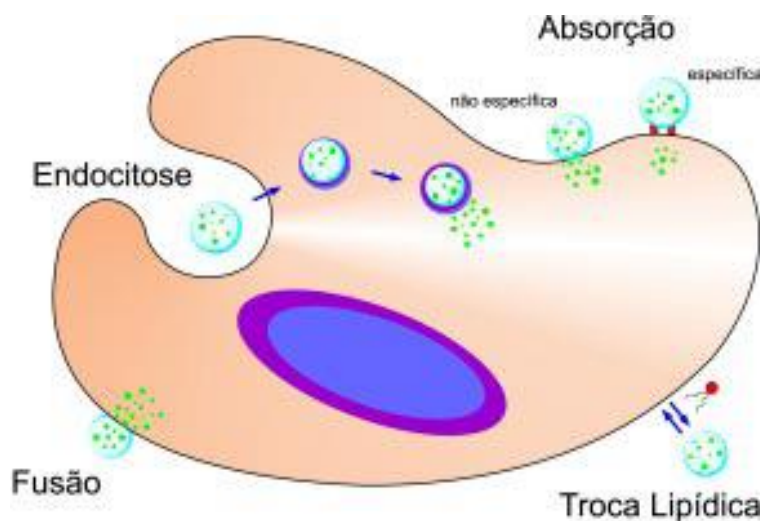
A sua utilização como sistemas transportadores de fármacos foi proposta, pela primeira vez, em 1971 por *Gregoriadis*, tendo sido bastante utilizados para esse efeito desde então.<sup>85</sup>

Os fármacos hidrossolúveis são encapsulados no interior da cavidade lipossomal, enquanto os fármacos lipossolúveis são incorporados na bicamada lipídica<sup>85,88</sup> (Fig. 5.4)



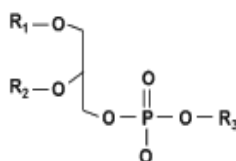
**Figura 5.4** - Lipossoma unilamelar contendo substâncias ativas solubilizadas na fase aquosa (1) e na bicamada lipídica (2). *Adaptado de 89.*

Devido à sua estrutura de bicamada ser tão semelhante à estrutura das membranas celulares, os lipossomas são capazes de interagir profundamente com as células do organismo. Vários tipos de interações de lipossomas com células da corrente sanguínea foram descritos, tais como a transferência ou troca de lípidos, endocitose, fusão (Fig. 5.5).<sup>90</sup>



**Figura 5.5** – Possíveis mecanismos de interação dos lipossomas com as células do organismo. Adaptado de 90.

Os lipossomas foram os primeiros nanossistemas utilizados em clínica.<sup>85</sup> São sistemas altamente versáteis, pois as suas propriedades físicas e químicas podem ser alteradas de acordo com os requisitos farmacêuticos e farmacológicos, de forma a permitir o direcionamento específico e a liberação progressiva e controlada do fármaco encapsulado. A sua versatilidade estrutural manifesta-se em termos de tamanho, composição, carga de superfície (Fig. 5.6), fluidez da membrana e habilidade para incorporar fármacos hidrofílicos e/ou lipofílicos.<sup>91</sup> Essas características conferem aos lipossomas maior eficácia terapêutica em relação a outras formas farmacêuticas. Para além disso, o fármaco encapsulado apresenta uma diminuição significativa de toxicidade e das interações medicamentosas, um maior tempo de permanência em circulação e um mínimo de reações inflamatórias locais, e sobretudo há um aumento da potencialização do efeito profilático.<sup>92</sup>



Fosfolípidios ( $R_3$ )	Cadeia hidrofóbica de ácido graxo ( $R_1, R_2$ )	Nomenclatura e abreviatura	Tc (°C)	Carga
Fosfatidilcolina (PC)	$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-(O)-$	Dioléilfosfatidilcolina (DOPC)	<0	Anfótera
$CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	$CH_3-(CH_2)_{12}-C(O)-$	Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)	23	Anfótera
	$CH_3-(CH_2)_{14}-C(O)-$	Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	42	Anfótera
	$CH_3-(CH_2)_{16}-C(O)-$	Diestearoilfosfatidilcolina (DSPC)	55	Anfótera
Fosfatidiletanolamina (PE)	$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-(O)-$	Dioléilfosfatidiletanolamina (DOPE)	<0	Anfótera
$CH_2CH_2NH_3^+$	$CH_3-(CH_2)_{16}-C(O)-$	Diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE)	74	Anfótera
Fosfatidilglicerol (PG)	$CH_3-(CH_2)_{12}-C(O)-$	Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)	13	Negativa
$CH_2CHOHCH_2OH$	$CH_3-(CH_2)_{14}-C(O)-$	Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)	35	Negativa
Fosfatidilserina (PS)	$CH_3-(CH_2)_{14}-C(O)-$	Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)	79	Negativa
$CH_2CHNH_3^+COO^-$	$CH_3-(CH_2)_{16}-C(O)-$	Diestearoilfosfatidilserina (DSPS)	79	Negativa

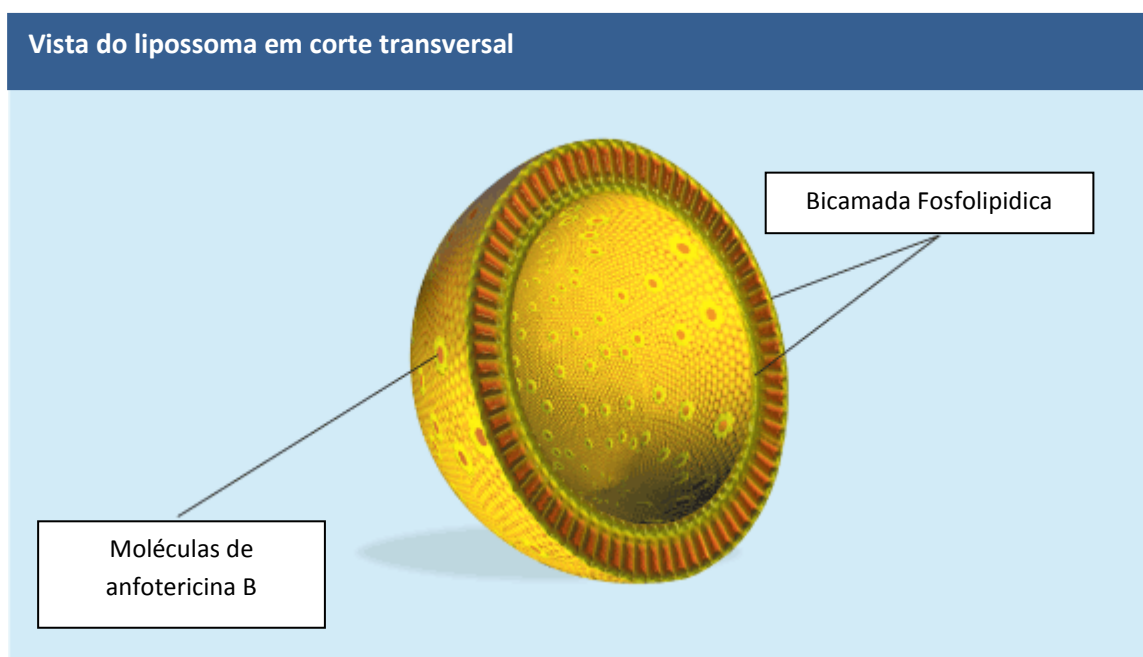
**Figura 5.6** – Exemplos de fosfolípidos utilizados na preparação de lipossomas e suas respectivas temperaturas de transição de fase (Tc) e a carga da molécula. *Adaptado de 91.*

Apesar das suas vantagens, os lipossomas são rapidamente eliminados da circulação sanguínea, o que pode ser minimizado pela modificação das suas características superficiais. Os lipossomas “de longa duração” podem ser obtidos *in vitro* por diferentes métodos. A estratégia mais utilizada é o revestimento da superfície lipossômica com polímeros hidrofílicos sintéticos, especificamente os polietilenoglicóis (PEG), cujo resultado são lipossomas estabilizados estericamente ou lipossomas peguilados. A camada hidrofílica superficial destes polímeros aumenta o tempo de permanência dos lipossomas em circulação, prevenindo o seu reconhecimento e consequente associação com as opsoninas no plasma. Consequentemente, é inibido o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema mononuclear fagocítico.<sup>91</sup>

O primeiro medicamento lipossomal a ser introduzido no mercado foi a doxorrubicina (Doxil<sup>®</sup>/Caelyx<sup>®</sup>) em 1995, para tratamento do sarcoma de Kaposi associado à SIDA. Caelyx<sup>®</sup> é uma formulação lipossômica, cujo fármaco, o cloridrato de doxorrubicina, está encapsulado em lipossomas com metoxipolietilenoglicol (MPEG) ligado à superfície

(lipossomas peguילים). Para além deste, outras formulações lipossomais destinadas também ao tratamento do cancro, têm sido introduzidas no mercado, tais como o Myocet<sup>®</sup> e o DaunoXome<sup>®</sup>, os quais reduziram significativamente a toxicidade cardíaca do fármaco.<sup>85-86</sup>

O AmBisome<sup>®</sup>, aprovado pela FDA em 1997, é uma preparação lipossômica de vesículas unilamelares pequenas, constituídas por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) e o fármaco anfotericina B (Fig. 5.7) na razão molar de 2:1: 0.8:0.4. A anfotericina B foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela FDA em 1965, e apesar da sua elevada toxicidade, a sua potência, espectro de ação e quase 50 anos de experiência clínica têm permitido que a anfotericina B permaneça como fármaco de eleição no tratamento da maioria das micoses sistémicas observadas em doentes imuno-deprimidos. Foi com base na toxicidade renal apresentada por este fármaco que surgiu a necessidade de serem desenvolvidas formulações menos tóxicas e, ao mesmo tempo, novos métodos de veiculação de anfotericina B, levando ao aparecimento do AmBisome<sup>®</sup>.<sup>93</sup>



**Figura 5.7** – AmBisome, sistema lipossomal unilamelar. Adaptado de 94.

De modo a comparar *in vitro* a toxicidade do AmBisome<sup>®</sup> com a da anfotericina B, o AmBisome<sup>®</sup> foi incubado a 37 °C durante 2 horas com glóbulos vermelhos humanos lavados. Em concentrações acima de 100 mg/L, o AmBisome<sup>®</sup> causou apenas 5% de hemólise comparativamente aos 92% de hemólise causados pela anfotericina B numa concentração de 1

mg/L. O AmBisome<sup>®</sup> é assim uma formulação lipossomal de anfotericina B com propriedades toxicológicas e farmacocinéticas únicas.<sup>95</sup>

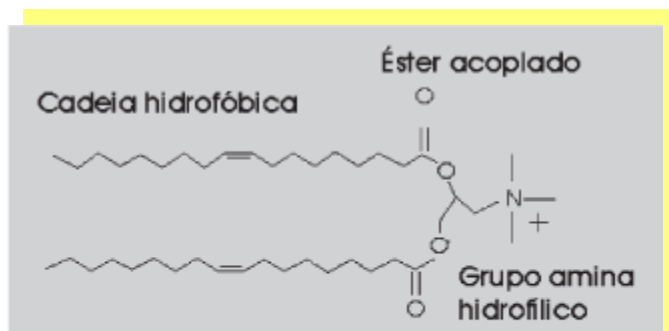
Desde o primeiro produto farmacêutico lipossomal (Caelyx<sup>®</sup>, aprovação em 1995) até ao último (Marqibo<sup>®</sup>, lipossomas de sulfato de vincristina, aprovação em 2012 pela FDA para tratamento da leucemia linfoblástica aguda), existem atualmente imensas formulações lipossomais de sucesso. A maioria destas formulações é para administração por via endovenosa devido à degradação dos lípidos no trato gastrointestinal.<sup>86</sup> Contudo, algumas das formulações mais recentes, ainda não aprovadas pela FDA, usadas apenas em ensaios clínicos, podem ser administradas através de injeção subcutânea ou inaladas como aerossóis.<sup>86</sup>

### **5.1.1.1. Os lipossomas Catiónicos na Terapêutica da Fibrose Cística**

No início da década de 1990, foi demonstrado, pela primeira vez, o uso de lipossomas catiónicos como sistemas eficientes de carregamento e libertação de ADN. A administração de ADN complexado a lipossomas catiónicos, em animais, mostrou uma melhoria da expressão terapêutica de proteínas em vários órgãos. Desta forma, prevê-se que a fibrose cística, entre muitas outras doenças, seja um potencial alvo de aplicação para a terapêutica genética com lipossomas.<sup>85</sup>

Na terapêutica genética, os lipossomas catiónicos representam, atualmente, o tipo de vetor não-viral mais utilizado. Estes sistemas apresentam determinadas vantagens quando comparados com os vetores virais, tais como: ausência de imunogenicidade e possibilidade de introduzir longos fragmentos de ADN no compartimento intracelular, para além de que o ADN apresenta uma carga efetiva negativa.<sup>75</sup> Desta forma, várias formulações à base de lipossomas catiónicos têm sido avaliadas em ensaios clínicos, por exemplo, no tratamento do cancro e fibrose cística.<sup>75</sup>

Os lipossomas catiónicos, tal como o nome indica, apresentam a sua superfície carregada positivamente e estão inseridos na categoria dos lipossomas polimórficos, ou seja, lipossomas que se tornam reativos em consequência de uma alteração na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática.<sup>91</sup> A Figura 5.8 apresenta a estrutura de um lípido catiónico 1,2-di-oleoil-3-trimetil-amónio-propano (DOTAP), usado na preparação de lipossomas catiónicos.<sup>9</sup>

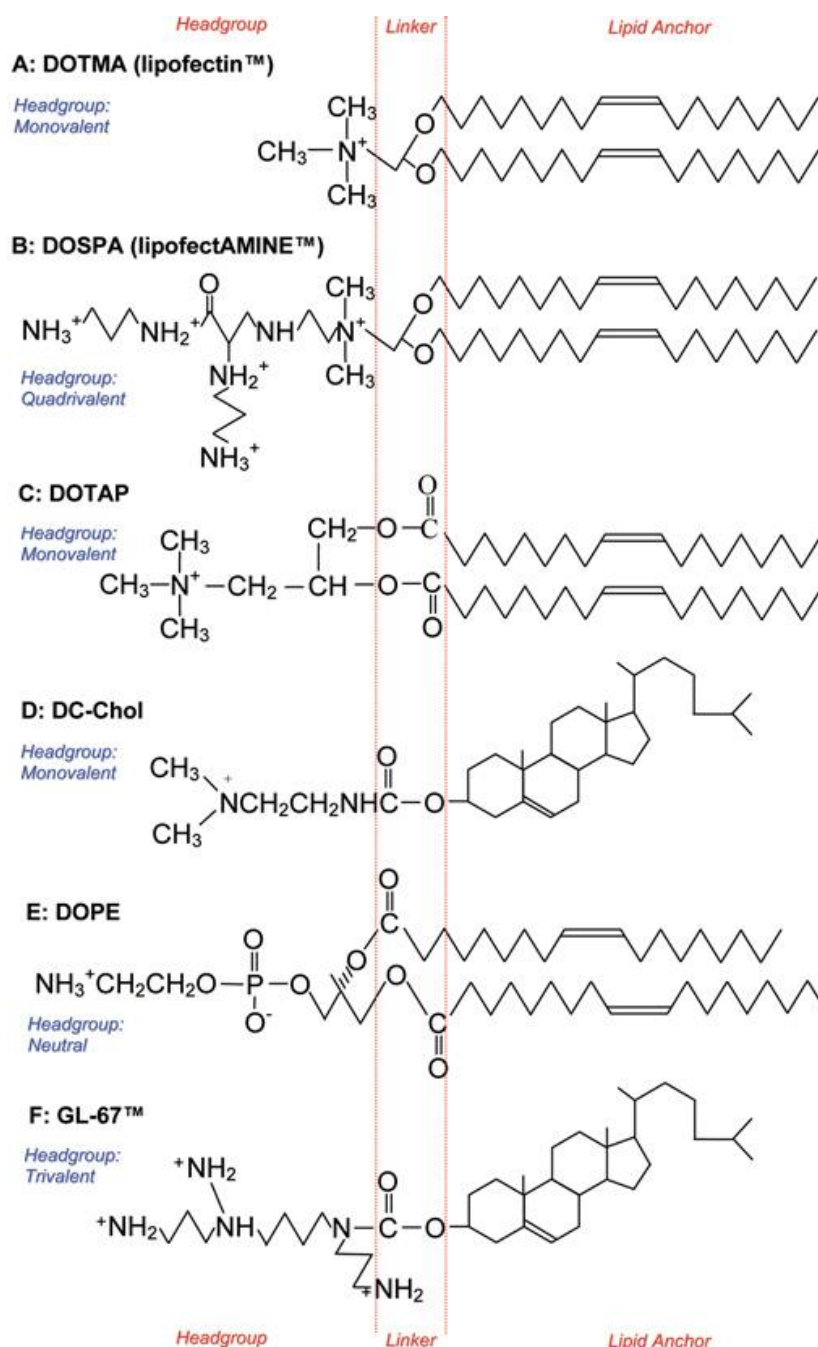


**Figura 5.8** – Estrutura de um fosfolípido catiónico 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano (DOTAP). A maioria dos outros lípidos catiónicos tem estrutura geral semelhante. *Adaptado de 91.*

A introdução dos lipossomas catiónicos em ensaios clínicos, como sistemas adequados de transfeção, foi feita em 1987 por *Felgner et al* e, desde então, tem-se mostrado como um dos caminhos mais promissores para introduzir um gene exógeno no interior das células.<sup>75</sup> Os lipossomas catiónicos interagem com o ADN através de interações eletrostáticas, já que a molécula de ADN é carregada negativamente. A carga total, no entanto, mantém-se com valor positivo. Isto vai permitir a interação eficiente do transportador lipossomal com a carga negativa da membrana celular, penetrando na célula, principalmente através de endocitose.<sup>91</sup>

No entanto, os lipossomas catiónicos também enfrentam alguns problemas na sua aplicação, na medida em que formam grandes agregados *in vivo* e apresentam sensibilidade sérica o que leva a uma certa instabilidade.<sup>83</sup>

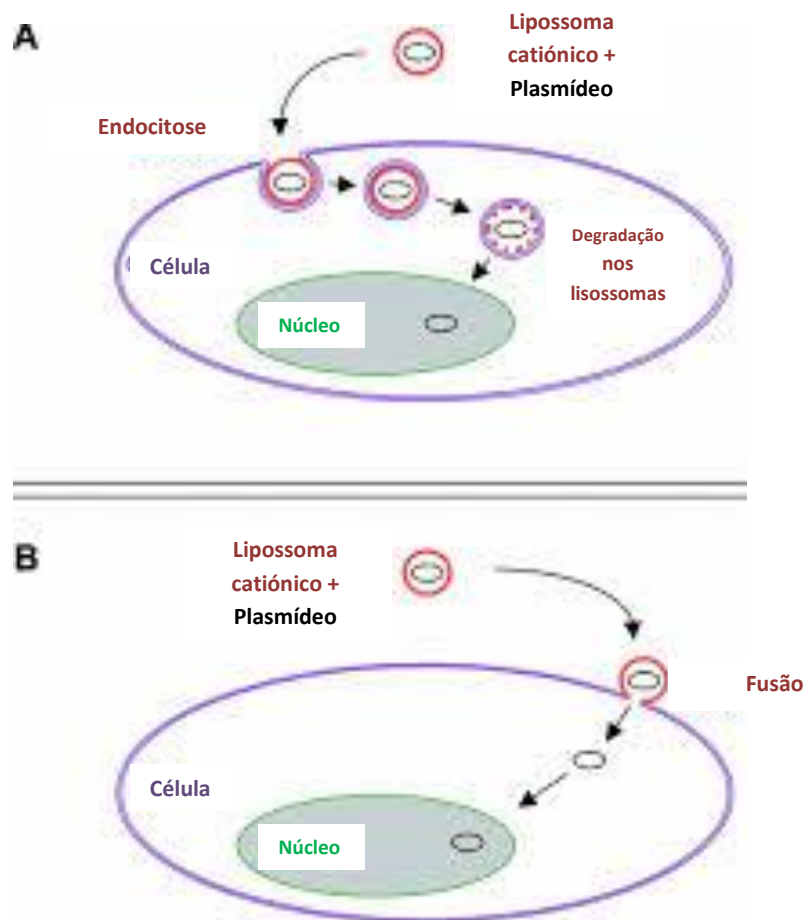
Os sistemas não virais de transporte de genes têm vindo a receber uma atenção crescente, nomeadamente os lipossomas catiónicos como DC-Chol/DOPE<sup>96-99</sup> (Fig. 5.9).



**Figura 5.9** – Estrutura química dos lípidos usados na formação de lipossomas catiónicos. *Adaptado de 97.*

Existem duas vias principais pelas quais os lipossomas catiónicos libertam o ADN plasmídico no compartimento intracelular (Fig. 5.10).<sup>97</sup> A via endocítica origina a formação de endossomas, que podem levar a uma eventual destruição do ADN plasmídico antes da sua libertação no citoplasma.<sup>97</sup>





**Figura 5.10** – Mecanismos de entrada nas células dos complexos lipossomas catiónicos – ADN plasmídico. (A) Endocitose e (B) Fusão direta com a membrana celular. *Adaptado de 97.*

Os ensaios clínicos com lipossomas catiónicos têm mostrado mediar a transferência genética em doentes com FC, sem qualquer evidência de inflamação, danos teciduais ou resposta imunitária sistêmica.

O primeiro estudo de terapêutica genética mediada por lipossomas, usando lipossomas DC-Chol/DOPE e ADN plasmídico CFTR, foi realizado em 1995 por *Caplen et al.*<sup>100</sup> Estes investigadores realizaram um ensaio duplamente cego, controlado por placebo em 15 doentes com FC. Do total dos doentes, 9 indivíduos foram tratados com lipossomas catiónicos DC-Chol/DOPE complexados com doses de ADN plasmídico CFTR de 30-300 µg, e os restantes 6 indivíduos receberam apenas lipossomas sem fármaco. As formulações foram libertadas no nariz, via aerossol. O sistema de libertação foi intensivo no tempo, ou seja, os indivíduos receberam elevadas doses ADN plasmídico CFTR através de sopros de aerossol de 10 em 10 minutos durante 7 horas. Não foram observados quaisquer efeitos adversos e as biópsias



nasais não apresentaram quaisquer variações histológicas ou imuno-histológicas. O ADN plasmídico e o ARN transgênico foram detetados na maioria dos doentes tratados. Verificou-se uma restauração parcial (20%) na função da CFTR (correção da diferença de potencial nasal), nos indivíduos com FC, após administração do ADN plasmídico CFTR. Esta restauração foi máxima por volta do 3º dia e voltou aos valores do pré-tratamento no 7º dia. Os autores concluíram que, embora os resultados obtidos sejam encorajadores, é necessário que, tanto a eficiência da transfeção como a duração da expressão aumentem para que esta metodologia tenha benefícios terapêuticos.<sup>100</sup>

*Gill et al*<sup>96</sup> descreveram um estudo duplamente cego, controlado com placebo para testar a eficácia e segurança de lipossomas DC-Chol/DOPE na libertação de ADN plasmídico CFTR para o epitélio nasal de doentes com FC. Os investigadores usaram uma razão molar de lipossomas DC-Chol/DOPE de 6:4 e 40-400 µg de ADN plasmídico CFTR. O epitélio respiratório que reveste a cavidade nasal foi alvo de instilação direta de complexos lipossoma-ADN. Isto permitiu monitorizar a evidência de uma potencial toxicidade e correção do defeito no transporte de iões na FC. Não foram observados quaisquer efeitos imunológicos, inflamatórios ou outros efeitos tóxicos e a função da CFTR, após a transferência genética, foi demonstrada usando duas técnicas independentes.<sup>96</sup>

Para evidenciar a segurança e eficácia dos lipossomas DC-Chol/DOPE como mediadores da transferência do gene CFTR, foi usado o epitélio respiratório da cavidade nasal como um tecido “substituto” do pulmão. Isto ofereceu um acesso simples e não invasivo a um epitélio com histologia e função similar ao epitélio traqueio-bronquial e defeitos similares nos eletrólitos associados à FC. Neste estudo, duplamente cego, controlado com placebo, e que incluiu 12 doentes com FC, uma única dose do complexo lipossoma-ADN foi instilada diretamente no epitélio nasal. Dos 12 doentes incluídos no estudo, 4 doentes receberam uma dose baixa de CFTR (0.8 mL contendo 40 µg de ADN pTRIAL10CFTR2 complexado com 0.4 µmol de lipossomas DC-Chol/DOPE), 4 doentes receberam uma dose elevada de CFTR (8 mL contendo 400 µg de ADN CFTR complexado com 4 µmol de lipossomas DC-Chol/DOPE, e os restantes 4 indivíduos foram tratados com placebo: 2 doentes receberam uma dose de vetor controlo (8 mL) contendo 400 µg de ADN pTRIAL10 complexado com 4 µmol de lipossomas DC-Chol/DOPE e os outros 2 receberam tampão HEPES Krebs. As soluções de tratamento foram libertadas nos doentes em 4 sessões distribuídas por 2 dias, tendo sido administrado aos doentes ¼ da dose total do tratamento em cada sessão (0.2 mL ou

2 mL). Não foram observados quaisquer efeitos adversos, nem se verificaram variações significativas nos parâmetros clínicos avaliados, assim como não houve registo de respostas imunológicas.<sup>96</sup> Estes resultados vão de encontro ao que foi descrito noutros estudos, nos quais os lipossomas DC-Chol/DOPE foram administrados em doentes com FC. Num estudo com transferência de genes CFTR através de adenovírus, *Knowles et al*, também, descreveram um doente com o mesmo sintoma.<sup>96</sup> Ambos os estudos usaram um método similar de instilação para libertar a solução de tratamento no nariz, embora se pense que a causa da dor no ouvido tenha sido consequência do método de administração, ou devido a uma subsequente infeção viral não clara.<sup>96</sup> Ao contrário dos vetores adenovirais, os lipossomas DC-Chol/DOPE parecem fornecer um veículo seguro de transferência de genes.<sup>96-98</sup>

Para avaliar a transferência do gene CFTR funcional, foram analisadas as diferenças no transporte de eletrólitos entre indivíduos normais e indivíduos com FC. O epitélio nasal dos indivíduos com FC mostrou absorção de sódio aumentada e decréscimo da secreção de cloreto comparado com os indivíduos sem doença. Os efeitos funcionais da transferência de ADN plasmídico CFTR foram avaliados *in vivo*, através da medida de diferença de potencial transepitelial, e *ex vivo*, usando microscopia de fluorescência.<sup>96</sup>

Este estudo mostrou que o uso de lipossomas catiónicos, para facilitar a transferência do gene CFTR para o epitélio nasal, é um procedimento seguro, sem quaisquer efeitos adversos observados mesmo quando foi administrada a dose mais elevada usada no ensaio. Para além disso, o estudo confirma que a transferência de genes mediada por lipossomas é funcional, uma vez que se verificou que 6 dos 8 doentes tratados com CFTR mostraram evidência da melhoria da função CFTR por meio de medições da diferença de potencial transepitelial ou por análise SPQ (microscopia de fluorescência).<sup>96</sup>

Embora a correção das anomalias no transporte de iões, em doentes com FC, que foi observada utilizando estes métodos, tenha sido transitória, num doente observou-se uma duração de 15 dias após o tratamento. No entanto, se a transferência de genes for bem-sucedida nas vias respiratórias inferiores, repetir a dosagem em intervalos relativamente curtos, pode ser uma solução para que, a longo prazo, se obtenha benefício terapêutico.<sup>96</sup>

Um estudo de *Hyde et al*<sup>99</sup> revelou que a expressão genética de CFTR seguida da administração de complexos lipossomas/ADN, no epitélio respiratório de doentes com FC, é transitória. Consequentemente, a administração em doses múltiplas é necessária para obter

uma expressão genética a longo prazo. Os mesmos autores já tinham mostrado, em estudos anteriores, que este tipo de administração aplicada a complexos lipossomas/ADN conseguia corrigir o defeito no transporte de íons em ratos. A segurança e eficácia da administração em doses múltiplas de complexos lipossomas DC-Chol/DOPE e genes CFTR foram avaliadas usando o epitélio respiratório da cavidade nasal como um tecido “substituto” do pulmão. Este foi o primeiro ensaio clínico para avaliar as dosagens repetidas de complexos lipossomas/ADN para qualquer doença genética. O ensaio, duplamente cego, incluiu 12 doentes com FC e todos receberam doses idênticas das soluções em cada narina. Do total dos doentes, 10 indivíduos foram tratados com ADN plasmídico CFTR complexado com lipossomas DC-Chol/DOPE, enquanto os restantes 2 doentes receberam placebo. Cada doente recebeu 3 doses, administradas com 4 semanas de intervalo. Para cada narina, a dose (8 mL contendo 400 µg de ADN plasmídico CFTR2-pTRIAL10 complexado com 4 µmol de lipossomas DC-Chol/DOPE, ou 8 mL de tampão HEPES Kreb’s para o placebo), foi dividida em 4 aliquotas de 2 mL, libertadas, diretamente nas narinas dos doentes, a cada 30 minutos durante, aproximadamente, 4 horas.<sup>73</sup> Os resultados deste estudo demonstraram que, embora não se tivesse observado uma melhoria significativa da diferença de potencial nasal, 6 dos indivíduos tratados foram positivos para a transferência do gene CFTR após administração de cada dose. Para além disso, todos os indivíduos que apresentaram resultados positivos para a função da CFTR, também foram positivos para a presença de ADN plasmídico, ARNm derivado do plasmídeo e proteína CFTR.<sup>99</sup>

Como descrito no estudo anterior,<sup>96</sup> uma única dose de complexos lipossomas/ADN CFTR não revelou efeitos adversos graves e não houve mudanças significativas em nenhum dos parâmetros clínicos medidos. É possível que o desenvolvimento de uma resposta imune anormal para os produtos expressos na sequência de transferência de gene possa ter consequências graves a longo prazo para a terapêutica genética na CF. Indivíduos com FC podem ter tolerância imunológica para CFTR normal, dependendo das suas mutações específicas. Neste estudo, a expressão do gene CFTR podia ter resultado numa resposta imunitária contra o produto do gene se os indivíduos com FC não possuísem tolerância imunológica. No entanto, após três doses dos complexos lipossomas/ADN CFTR, não foi observada a presença de auto-anticorpos ou respostas imunitárias celulares contra o gene CFTR normal.<sup>99</sup> Os resultados das medidas de eficácia, usadas neste estudo, sugerem que, ao contrário de elevadas doses de adenovírus recombinante, os complexos ADN/lipossomas

podem ter sucesso se forem administradas em doses sucessivas sem aparente perda de eficácia.<sup>99</sup>

Em alternativa aos lipossomas DC-Chol/DOPE, os lipossomas catiónicos DOTAP foram usados em 1997 por *Porteous et al*<sup>101</sup>, num ensaio de libertação, via aerossol nasal, de 400 µg de ADN plasmídico CFTR em doentes com FC. Os lipossomas DOTAP foram escolhidos pelos investigadores para este ensaio, porque as administrações repetidas em ratos foram bem toleradas e, quando complexados com CFTR-pCMV e administrados em ratos mutantes transgênicos para a FC, a correção foi de, aproximadamente, 80% no défice eletrofisiológico da traqueia, e detetado 8 a 9 dias após administração. O estudo em doentes com FC, duplamente cego, randomizado e controlado por placebo, incluiu um total de 16 indivíduos. Os doentes foram divididos em 2 grupos, tratando-se 8 indivíduos com uma única dose constante de 400 µg de CFTR-pCMV:2.4 mg DOTAP num volume final de 5.6 mL e os outros 8 doentes com uma solução tampão de composição e volume equivalentes. O spray nasal foi administrado pelos próprios doentes sob supervisão. Todos os doentes foram monitorizados para sinais e sintomas duas semanas antes do tratamento e quatro semanas após o tratamento. A biópsia nasal permitiu quantificar as células inflamatórias 3 dias após o tratamento em estudo. Tal como nos resultados dos estudos anteriormente descritos, não houve qualquer evidência de excesso de inflamação nasal, de marcadores da inflação na circulação ou de quaisquer outros eventos adversos associados ao tratamento ativo. A transferência e expressão genética foram medidas através da técnica de PCR. O ADN transgênico foi detetado em 7 dos 8 doentes tratados, 28 dias após o tratamento e o vetor derivado do ARNm CFTR foi detetado em 2 dos 7 doentes durante mais de 3 dias e durante mais de 7 dias. A correção parcial da função da CFTR verificou-se em 2 doentes tratados, o que foi medido através do transporte transepitelial de iões (diferença de potencial nasal). Os resultados encontrados neste estudo, para o nível de transferência genética e correção funcional da CFTR foram comparáveis aos descritos anteriormente usando vetores de adenovírus ou outros complexos lipossoma-ADN. Segundo os autores, os dados de segurança observados neste estudo, relativamente ao veículo de transferência do material genético, justificam estudos futuros do efeito da transferência genética de CFTR, mediada por DOTAP, nos pulmões de doentes com FC. Um estudo nesse sentido irá determinar se os níveis terapêuticos de transferência expressão de genes podem ser estabelecidos e mantidos, por dosagem repetida, na ausência de efeitos tóxicos.<sup>101</sup>

O primeiro ensaio de transferência do gene CFTR, mediada por lipossomas, nos pulmões de doentes com FC foi desenvolvido por *Alton et al*<sup>102</sup> em 1999. O ensaio duplamente cego e controlado por placebo incluiu 16 doentes com FC, tendo-se usado lipossomas GL-67<sup>TM</sup>/DOPE/DMPE-PEG<sub>5000</sub>. Os doentes foram divididos em 2 grupos: 8 indivíduos foram tratados com 42.2 mg de ADN plasmídico CFTR complexado com os lipossomas GL-67<sup>TM</sup>/DOPE/DMPE-PEG<sub>5000</sub>, por meio de nebulização nos pulmões seguida, uma semana mais tarde, por administração no nariz; os restantes 8 indivíduos (grupo controlo) foram sujeitos ao mesmo protocolo de tratamento mas apenas com administração de lipossomas. A segurança do ensaio foi analisada clinicamente, através de radiografia, função pulmonar e análise histológica. A eficácia analisada por análise de ADN CFTR e ARMm, diferença de potencial *in vivo*, ensaios de epifluorescência para medir o efluxo de cloreto e adesão bacteriana. Os resultados mostraram que, 7 dos 8 doentes tratados com os complexos ADN CFTR/lipossomas descreveram sintomas ligeiros de infeção pelo vírus influenza (febre elevada, dor de cabeça e dores musculares), detetados 6 horas após a nebulização, os quais desapareceram dentro de 36 horas. Estes sintomas transitórios não foram observados nos doentes tratados com placebo, e quando o ADN plasmídico foi purificado para remover as endotoxinas, os autores sugeriram que o elevado conteúdo em citosina desmetilada e guanina do ADN bacteriano, poderia ser o responsável por estes resultados. A administração pulmonar resultou numa condutância do cloreto, significativamente, restaurada (25%,  $p < 0.05$ ) nos doentes tratados com ADN plasmídico CFTR e não nos doentes tratados com placebo, quando medido o efluxo de cloreto e a diferença de potencial *in vivo*. Também se observou uma redução na adesão bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa* e um decréscimo nos marcadores de infeção pulmonar, não tendo sido detetadas alterações no transporte anormal de sódio. Os autores do estudo sugerem que a transferência do gene CFTR, mediada por lipossomas, pode influenciar significativamente o defeito de cloreto subjacente nos pulmões dos doentes com FC.<sup>102</sup>

Após o gene CFTR ser descoberto em 1989, houve uma esperança considerável de que a terapêutica genética poderia ser rapidamente desenvolvida. No entanto, esta provou ser um campo extremamente desafiante visto que já foram realizados mais de 25 ensaios de terapêutica genética até à data,<sup>13,54</sup> utilizando quer vetores virais quer vetores à base de lípidos catiónicos, os quais têm mostrado sucesso limitado. Tem sido observado que, mesmo depois de uma implantação bem sucedida do gene CFTR, as células perdem a expressão após

algumas semanas. A terapêutica genética, que deve provar ser terapeuticamente eficaz, pode ser utilizada para tratar todos os doentes com FC, independentemente da mutação CFTR, no entanto, esta abordagem ainda não produziu o resultado desejado e tão prometido para a FC. Atualmente, está a ser desenvolvido um estudo de terapêutica genética com doentes do Reino Unido, utilizando-se um vetor à base de lípidos catiónicos (GL67A/pGM169).<sup>13</sup>

## 5.2. Terapêuticas moduladoras da CFTR

Até agora, sob o ponto de vista da terapêutica disponível comercialmente, todos os tratamentos da FC têm apresentado como alvo os danos causados pelo defeito na CFTR mais do que o próprio defeito genético. Uma alternativa à terapêutica genética, que se mostra mais promissora, é o desenvolvimento de pequenas moléculas que têm como alvo as mutações específicas da CFTR, cuja investigação tem mostrado resultados importantes nos últimos 10 anos.

Estes novos desenvolvimentos são baseados numa melhoria do entendimento da estrutura e disfunção da CFTR na FC. Os compostos são divididos em três grupos: corretores da CFTR, potenciadores da CFTR e supressores da CFTR,<sup>13,74</sup> e algumas moléculas estão já disponíveis comercialmente, sendo detalhadas mais à frente, na correspondente categoria a que pertencem.

### 5.2.1. Corretores da CFTR

Os compostos corretores são projetados para aumentar a quantidade de proteína CFTR funcional existente à superfície da célula.<sup>13,74</sup> Têm sido direcionados, essencialmente, para as mutações da classe II, tais como a mutação delta F508. Está atualmente sob investigação clínica uma molécula, VX-809, cujos estudos *in vitro* demonstraram que esta se comporta como um eficaz corretor seletivo da CFTR. Num ensaio de fase II, o VX-809 foi administrado, por via oral, a adultos homozigotas para a mutação delta F508. Os resultados mostraram que os níveis de cloro no suor de doentes com FC tratados com VX-809 foram reduzidos de uma forma dose-dependente. No que diz respeito à medida da função pulmonar, através dos valores de FEV1, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo de tratamento, bem como não se observaram diferenças entre os parâmetros da diferença de potencial nasal dependente da CFTR. Assim, os autores deste estudo concluíram que serão necessários mais estudos para avaliar o impacto do VX-809 nas vias respiratórias e para determinar o benefício do seu uso na prática clínica. Para além de VX-809, vários outros corretores de CFTR foram identificados, alguns dos quais estão sob investigação pré-clínica.<sup>74</sup>

### 5.2.2. Supressores da CFTR

As mutações “*nonsense*” estão entre 5% a 10% das mutações que ocorrem na FC, com elevadas variações da região. As mutações “*nonsense*” da CFTR de classe I podem ser alvo de modulação usando supressores de códons de terminação prematuros que atuam durante a tradução da proteína.<sup>13,74</sup> Estas substâncias quebram a fidelidade de tradução, permitindo a incorporação de um aminoácido e a continuação da tradução até à terminação normal do produto transcrito. Existem vários exemplos destes agentes. Por exemplo, o tratamento de células *in vitro* com baixas doses de um antibiótico aminoglicosídeo demonstrou que as mutações *stop* associadas à CFTR podiam ser suprimidas. Os antibióticos aminoglicosídeos ligam-se a um local específico do ARN ribossômico, quebrando, deste modo, o reconhecimento codão-anticodão pela extremidade aminoacil do ARN de transferência. Este mecanismo vai provocar erros na leitura do código do ARN, permitindo a inserção de aminoácidos alternativos no local do codão mutado.<sup>103</sup>

O antibiótico geralmente mais investigado para este fim, a gentamicina, atua permitindo que um aminoácido seja incorporado no lugar de um codão *stop* e, então, a tradução continua normal. Foi realizado um estudo, no qual foi investigada a eficácia da gentamicina nasal aplicada topicamente em 24 doentes com FC. Neste estudo, 19 doentes com FC eram homozigotas (n=11) ou heterozigotas (n=8) para as mutações CFTR *stop* e um total de 5 doentes era homozigota para a mutação delta F508 da classe II. A gentamicina mostrou reduzir significativamente a diferença de potencial nasal (uma medida da função da CFTR) em todos os doentes com mutações *stop* (de uma diferença de potencial nasal de  $45 \pm 8$  passaram para  $34 \pm 11$  mV,  $p = 0.005$ ), enquanto não foi observada qualquer diferença significativa nos doentes homozigotas com a mutação delta F508.<sup>104</sup>

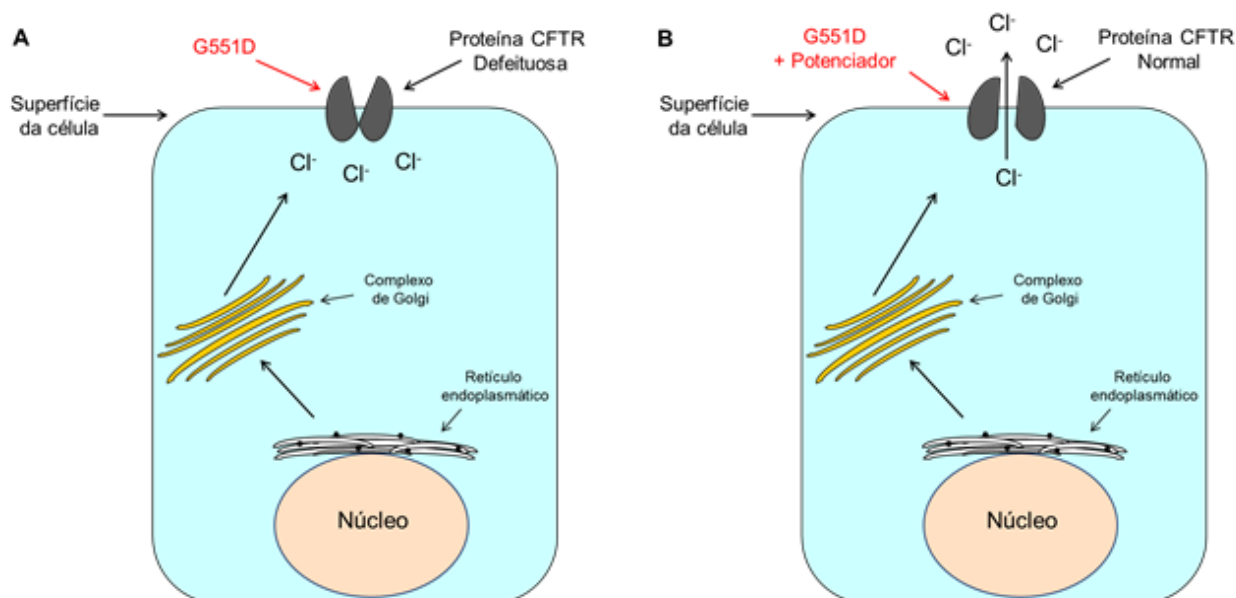
O ataluren<sup>®</sup> (“nome comercial provisório”), formalmente conhecido como PTC124, é um novo produto candidato ao tratamento das mutações “*nonsense*” da FC, que é potencialmente mais eficaz como agente supressor do que a gentamicina. Trata-se de um fármaco oral que permite aos ribossomas continuarem a produzir CFTR funcional apesar da presença de códons de terminação imaturos.<sup>13,54</sup> Usando uma linha celular estável, o ataluren<sup>®</sup> mostrou ser 4 a 15 vezes mais potente relativamente aos controlos. O agente está disponível numa formulação de uso fácil e atualmente encontra-se em fase de ensaios clínicos. Através dos ensaios clínicos iniciais, os autores concluíram que o ataluren<sup>®</sup> pode induzir a produção de CFTR funcional e



ser bem tolerado. Um estudo de fase II em 19 adultos doentes com FC, tendo pelo menos uma mutação “*nonsense*” CFTR e um transporte de cloreto total nasal anormal, mostrou que o ataluren<sup>®</sup> administrado três vezes ao dia melhora o transporte de cloreto total com uma velocidade de resposta ao tratamento de 61% . Houve, também, uma tendência não significativa para a melhoria do FEV1 e uma redução de 23% na tosse no final do estudo (dia 84).<sup>105</sup> Os ensaios de fase III deste agente foram terminados em 2011 e apresentados na Conferência Europeia de Fibrose Cística em 2012. Segundo estes resultados, verificou-se uma diferença de 3% na variação relativa da linha base do FEV1 comparativamente ao placebo ao fim de 48 semanas, a qual não atingiu significado estatístico.<sup>54</sup>

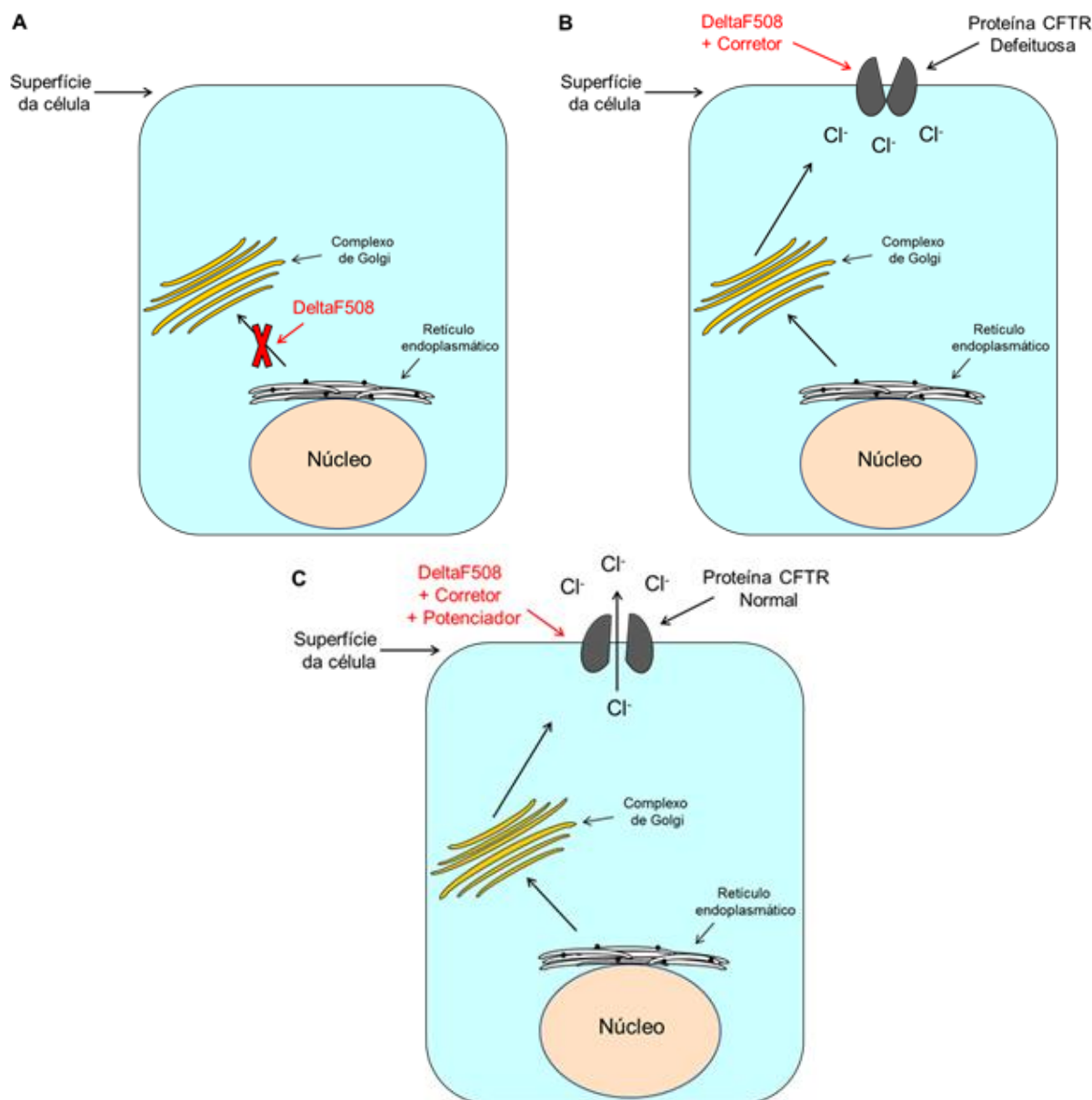
### 5.2.3. Potenciadores da CFTR

A mutação G551D, pertencente à classe III de mutações da CFTR, é a que apresenta maior prevalência dentro do tipo de mutações do tipo “*gating*”. É causada pela substituição do aminoácido glicina pelo aspartato na posição 551 no domínio 1 de ligação do nucleótido no gene da CFTR.<sup>106</sup> Os potenciadores da CFTR aumentam a probabilidade de abertura dos canais da CFTR que possuem mutações do tipo “*gating*” (classe III) ou de condutância (classe IV)<sup>13,74</sup> (Fig. 5.11).



**Figura 5.11** - Representação esquemática da ação de medicamentos potenciadores da CFTR com a mutação G551D. A: Célula com a mutação G551D. B: Célula com a mutação G551D sob a ação de um fármaco potenciador. Adaptado de 107.

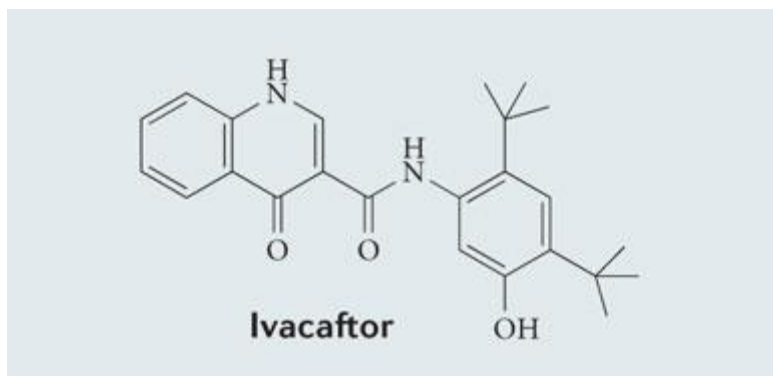
Existem evidências adicionais, a partir de estudos *in vitro*, de que os potenciadores da CFTR podem também aprimorar a probabilidade de abertura dos canais da CFTR com mutações da classe II, tal como a delta F508. Contudo, para que a potenciação da CFTR da mutação delta F508 possa ocorrer neste sistema, o canal expresso de forma recombinante já tem que estar localizado na membrana celular. Consequentemente, os potenciadores da CFTR sozinhos não podem ser usados para tratar as mutações das classes I e II (Fig.5.12), as quais são caracterizadas pela ausência ou falta de sintetização da proteína CFTR.<sup>74</sup>



**Figura 5.12** - Representação esquemática da ação conjunta de medicamentos corretores e potenciadores da CFTR com a mutação delta F508. A: Célula com a mutação delta F508. B: Célula com a mutação delta F508 sob a ação de um fármaco corretor. C: Célula com a mutação delta F508 sob a ação de um fármaco corretor e outro potenciador. *Adaptado de 107.*

### 5.2.3.1. A aplicação do Ivacaftor na Terapêutica da Fibrose Cística

O Ivacaftor [N-(2,4-di-tert-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida]] pertence à classe de fármacos potenciadores da CFTR, apresentando a fórmula molecular  $C_{24}H_{28}N_2O_3$  (Fig. 5.13) e um peso molecular de 392.49.<sup>50</sup>

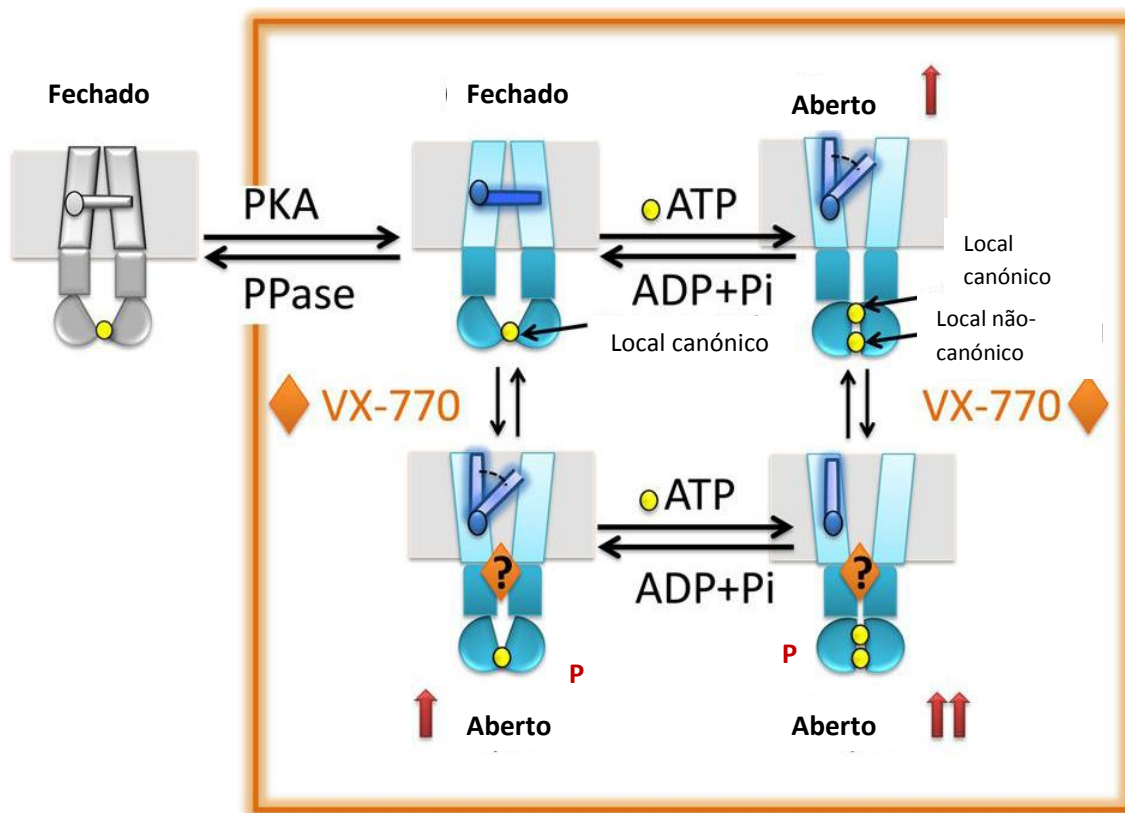


**Figura 5.13** – Estrutura química do Ivacaftor. *Adaptado de 108.*

O ivacaftor, formalmente conhecido como VX-770, tem como alvo, especificamente, a mutação de classe III, G551D.<sup>74</sup> Está disponível comercialmente sob a forma de comprimidos para administração oral (Kalydeco<sup>®</sup>) e é o único medicamento modulador do CFTR atualmente aprovado pela FDA e pela *European Medicine Agency* (EMA). Este medicamento é aprovado para a mutação G551D. Recentemente mais 8 mutações foram selecionadas, para o tratamento com ivacaftor, são elas: G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P e G1349D.<sup>107</sup> A dose de ivacaftor aprovada pela FDA para doentes com pelo menos 6 anos de idade, sem comprometimento renal ou hepático, e que possuam pelo menos uma mutação G551D no gene CFTR, é de um comprimido de 150 mg de 12 em 12 horas, tomado na presença de alimentos que contenham gordura.<sup>109</sup>

O ivacaftor (VX-770) foi licenciado em 2012, tanto nos Estados Unidos como na Europa (em 23 de Julho de 2012, a Comissão Europeia concedeu uma Autorização de Introdução no Mercado, válida para toda a União Europeia, para o medicamento Kalydeco<sup>®</sup>),<sup>110</sup> para ser usado em doentes com FC com seis anos ou mais que têm pelo menos uma cópia da mutação de classe III, *Gly551Asp* (G551D). O ivacaftor é, assim, o primeiro tratamento disponível para abordar diretamente o defeito genético subjacente à FC.<sup>13,106</sup> Trata-se de um potenciador

biodisponível oralmente que é projetado para aumentar o tempo em que os canais ativos da CFTR na superfície da célula permanecem abertos (Fig. 5.14).<sup>13,54</sup>



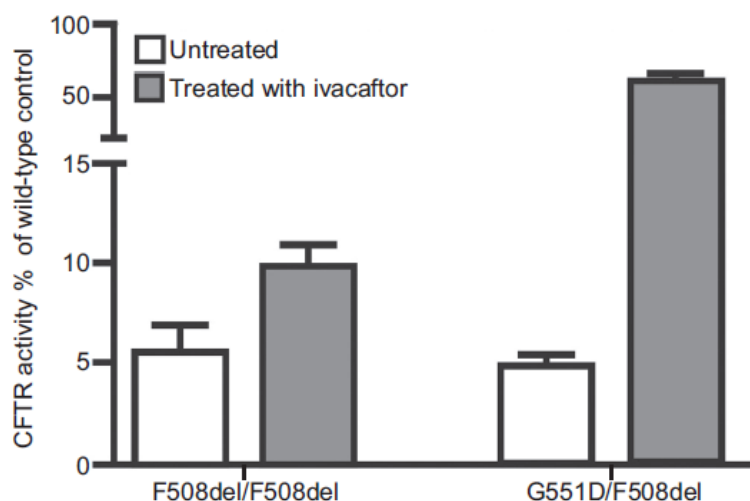
**Figura 5.14** – O Ivacaftor aumenta a abertura do canal da CFTR por um mecanismo dependente da fosforilação e independente de ATP. *Adaptado de 111.*

O ivacaftor foi identificado por rastreio de mais de 228000 compostos usando um rastreio de alto rendimento através de um ensaio de fluorescência de potencial de membrana da célula de forma a identificar potenciadores da CFTR.<sup>13,74,112</sup> Os estudos iniciais *in vitro* do efeito do ivacaftor na secreção de cloreto mediada pela CFTR, foram desenvolvidos em linhas celulares recombinantes e culturas primárias de células epiteliais brônquicas humanas. Estes estudos demonstraram que o ivacaftor aumentou o transporte de cloreto através do aumento da probabilidade do canal da CFTR se manter aberto, e aumento do batimento ciliar.<sup>13,74,112,113</sup>

Os autores do estudo descreveram que o contacto com 10µM de ivacaftor aumentou, cerca de 6 vezes mais, a probabilidade de abertura dos canais da CFTR com a mutação G551D.<sup>74,114</sup> Estes resultados foram validados em culturas de células epiteliais brônquicas humanas

isoladas a partir dos brônquios dos doentes com FC-G551D. As culturas primárias de células epiteliais brônquicas são usadas para representarem cuidadosamente o meio patológico nato da doença pulmonar na FC e podem ser usadas para caracterizar, realmente, a farmacologia dos moduladores da CFTR. Nas células epiteliais brônquicas com os genótipos G551D/delta F508 e delta F508/delta F508, o ivacaftor mostrou potenciar a secreção de cloreto mediada pela CFTR, com um efeito maior observado nas células G551D/delta F508 (50% de atividade da CFTR *wild-type*) (Fig. 5.15).<sup>74,112</sup>

Contudo, o mecanismo exato de atuação do ivacaftor no canal da CFTR não está completamente esclarecido.<sup>13</sup>



**Figura 5.15** – O ivacaftor restaura a condutância transmembranar da proteína reguladora CFTR na FC com a mutação G551D, em culturas primárias de células humanas epiteliais brônquicas. A atividade da CFTR foi avaliada medindo o transporte de cloreto dependente da CFTR, nas células mutadas relativamente às células *wild-type* (n=16). O Ivacaftor aumentou a atividade da CFTR G551D/delta F508 em cerca de 50%. *Adaptado de 74.*

A segurança e eficácia do ivacaftor em doentes com FC com pelo menos uma mutação *Gly551Asp* (G551D) na CFTR foram avaliadas em dois grandes ensaios multicêntricos, duplamente-cegos randomizados e placebo-controlados.<sup>13,106,112</sup> Os indivíduos destes ensaios apresentavam-se clinicamente estáveis, com idade superior a 12 anos (n=161) e crianças com idades entre os 6 e os 12 anos (n=52). Os doentes de ambos os estudos foram randomizados numa relação de 1:1 para receberem 150 mg de ivacaftor oral ou placebo de 12 em 12 horas durante 24 semanas, em adição à sua terapêutica já prescrita para a FC. A medida primária de

eficácia do tratamento foi a variação no FEV1. O ivacaftor foi administrado com alimentos contendo gordura, porque isso aumenta a exposição dos doentes ao ivacaftor 2 a 4 vezes mais. O efeito do tratamento com ivacaftor, nos adultos e adolescentes (média de idade 26 anos), com um FEV1 médio de 63,6%, foi um aumento no FEV1 de 10,6%.<sup>13,24,54,113</sup> Os indivíduos tratados com ivacaftor também tiveram uma diminuição de 55% nas exacerbações respiratórias, uma redução nos valores de cloreto no suor (uma medida da função de CFTR) na ordem de 50-60 mmol/L, e um ganho de peso de 2.7 kg a mais do que no grupo placebo.<sup>13,24,106,113</sup> As melhorias na qualidade de vida, medidas pelo *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised*, também foram observadas nos doentes tratados com ivacaftor.<sup>13,106,113</sup> O ivacaftor é o primeiro agente que mostra uma redução do nível de cloreto no suor para valores abaixo do limite de diagnóstico para a FC (60 mmol/L).<sup>13</sup>

O segundo estudo avaliou o ivacaftor em 52 crianças (idade média de 9 anos), que apresentavam um FEV1 maior (média de 84%) do que o grupo anterior. Apenas quatro crianças tiveram um FEV1 de 70%. Um efeito global previsto do tratamento com ivacaftor de 9,3% no FEV1, foi evidenciado. As melhorias foram mantidas até à semana 72 do estudo “open-label”. Embora houvesse aumentos semelhantes em peso e diminuição de cloreto no suor, como revelado no estudo dos adultos e adolescentes, não houve melhoria na qualidade de vida, avaliada pelo *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised*.<sup>13,113</sup>

Não foram observados efeitos adversos quando o grupo de indivíduos tratado com ivacaftor foi comparado com o grupo placebo. Contudo, embora os dados de segurança estejam disponíveis durante 60 semanas de tratamento nos ensaios, o perfil de segurança do ivacaftor a longo prazo, ao longo da vida, ou a sua segurança nas crianças é desconhecida.<sup>13</sup>

Os dados *in vitro* sugerem que o ivacaftor tem um efeito similar noutras formas da CFTR com mutações do tipo “gating” (mutações da classe III) e suportam a investigação de um potencial benefício clínico do ivacaftor em doentes com FC que possuem mutações do tipo “gating” da CFTR para além da G551D. A extensão da licença do ivacaftor a outras mutações da classe III, poderá permitir que 10-15% dos doentes com FC beneficiem deste tratamento. Contudo, os ensaios clínicos nos doentes com mutações individuais da classe III são difíceis de realizar devido à baixa frequência com que estas mutações ocorrem.<sup>13</sup>

A mutação da CFTR mais prevalente nos doentes com FC é a mutação delta F508, pertencente à classe II de mutações.<sup>106,114</sup> Aproximadamente 90% dos doentes com FC do

Norte da América possuem a mutação delta F508 em pelo menos um alelo e, aproximadamente, metade destes são homozigotas.<sup>114</sup> A mutação delta F508 da CFTR causa um enrolamento inadequado da proteína, o que resulta numa pequena quantidade ou nenhuma proteína na superfície da célula, devido à sua destruição no retículo endoplasmático.<sup>13,114</sup> Para além disso, qualquer CFTR-delta F508 que atinge a superfície da célula pode, também, apresentar um defeito na abertura e fecho do canal,<sup>13,106,115</sup> conhecido como defeito do tipo “gating”.<sup>115</sup>

Estudos realizados *in vitro* têm mostrado que o ivacaftor aumenta a atividade dos canais da CFTR-delta F508, que atingem a superfície da célula.<sup>13,106</sup> No entanto, a monoterapia com ivacaftor estudada em doentes com CFTR-delta F508, apresentou muito menos sucesso do que nos doentes com a mutação G551D.<sup>13</sup> Foi realizado um estudo, de fase II, dividido em duas partes, multicêntrico, randomizado (4:1), placebo-controlado e duplamente-cego com ivacaftor (Kalydeco®). Este estudo contou com 140 indivíduos homozigotas para a mutação delta F508, com idades iguais ou superiores a 12 anos, randomizados (ivacaftor, n=112; placebo, n=28) para receberem 150 mg de ivacaftor oral de 12 em 12 horas ou placebo durante 16 semanas (parte A), seguido de um período “open-label” de 96 semanas para os indivíduos que apresentassem critérios de elegibilidade (parte B).<sup>115</sup> A razão para selecionar os indivíduos para o período “open-label” foi a determinação das alterações ocorridas, relativamente à *baseline* observada na parte A do estudo. Os critérios de elegibilidade pré-específicos para englobar os indivíduos na parte B do estudo, incluíram variação no FEV1  $\geq$  10% ao longo das 16 semanas ou uma redução da concentração de cloreto no suor  $\geq$  15 mmol/L. Um total de 104 indivíduos (92,9%) no grupo do ivacaftor e 26 (92,9%) no grupo placebo concluiu a dosagem na parte A do estudo. As razões mais frequentes para a interrupção do tratamento foram um evento adverso (3 indivíduos, 2,7%, no grupo do ivacaftor e 2 indivíduos (7,1%) no grupo placebo). Foram qualificados, para a parte B do estudo, 42 doentes do grupo ivacaftor (37,5%) e 6 doentes do grupo placebo (21,4%).<sup>115</sup>

O tratamento com ivacaftor não revelou melhoria na primeira medida de eficácia, ou seja, o aumento do FEV1 após 16 semanas de tratamento, ou em qualquer das medidas de eficácia secundárias, como é o caso do ganho de peso, frequência de exacerbações pulmonares ou melhoria da qualidade de vida dos doentes em estudo. Embora uma pequena redução na concentração de cloro no suor tenha sido verificada, na primeira parte do estudo, esta não foi observada na população em estudo “open-label”.<sup>115</sup>



O VX-809 (um corretor da CFTR) revelou alguma eficácia, *in vitro*, no aumento do processamento da CFTR-delta F508 e transporte de cloreto em culturas de células humanas epiteliais bronquiais.<sup>13</sup> Contudo, o efeito foi muito menor do que o observado com o ivacaftor, e apenas 14% das células epiteliais mostraram melhoria na secreção e processamento de cloreto. Embora o nível exato de correção da CFTR necessário para prevenir ou diminuir a progressão da doença seja desconhecido, sugere-se que a libertação de 25% de CFTR para a superfície das células epiteliais restaura a taxa normal do transporte de muco para o epitélio das vias respiratórias na FC. Estudos em humanos de monoterapia com VX-809 indicaram um pequeno efeito, dependente da dose, no cloreto do suor (<10 mmol/L) mas nenhum efeito na função pulmonar dos doentes ou resultados descritos pelos doentes após um período de 28 dias de estudo. Contudo, coloca-se a hipótese, baseada nos resultados obtidos *in vitro* com as culturas de células epiteliais, que a combinação de um corretor da CFTR (VX-809) e um potenciador da CFTR (ivacaftor) pode ser mais efetiva do que cada um dos agentes por si só. Assim, encontra-se em desenvolvimento um ensaio clínico, de fase II, para avaliar a eficácia e a segurança do VX-809 usado em combinação com o ivacaftor para tratar doentes com FC homozigotas ou heterozigotas para a mutação delta F508.<sup>13,106</sup>

Os dados de segurança clínica do ivacaftor obtidos até ao momento sugerem que o tratamento é bem tolerado. Não obstante, as observações têm limitações relevantes que incluem o facto de 52% dos indivíduos estudados serem voluntários saudáveis e que alguns subgrupos importantes da população alvo (como as crianças entre os 6 e os 11 anos) tiveram uma participação muito limitada no estudo. Os efeitos adversos mais comuns do ivacaftor incluíram tosse, exacerbação pulmonar, dor de cabeça, tonturas, congestão nasal, dor orofaríngea, náuseas e erupção cutânea.<sup>116</sup>



## 6. CONCLUSÃO

---

O contínuo esforço dos investigadores e das equipas de profissionais de saúde tem permitido aumentar a esperança média de vida dos doentes com Fibrose Cística, bem como melhorar significativamente a sua qualidade de vida.

A descoberta do gene da CFTR gerou grandes expectativas no desenvolvimento de novas terapêuticas para a cura efetiva da doença, o que permitiria ir além do que é atualmente possível e que contempla uma terapêutica essencialmente assente na prevenção de infeções respiratórias e no tratamento de sintomas.

A terapêutica genética tem sido estudada ao longo dos anos e o método de transferência de ADN da CFTR normal, para o interior das células epiteliais, já foi testado através de duas técnicas. Foram utilizados vetores virais (adenovírus), os quais apresentaram respostas imunitárias exageradas; e sistemas não virais, os lipossomas. A terapêutica genética com lipossomas catiónicos revelou uma correção transitória do defeito genético, no entanto, com um sucesso insuficiente para permitir uma transição para a clínica. Desta forma a terapêutica genética na Fibrose Cística permanece como tratamento experimental.

A grande novidade está nas novas abordagens moduladoras da CFTR, como é o caso da classe dos potenciadores. O Ivacaftor (Kalydeco<sup>®</sup>), um potenciador da CFTR, foi o primeiro agente a ser aprovado, pela FDA e pela EMA em 2012, na terapêutica de doentes com FC com a mutação G551D e com idade igual ou superior a 6 anos. Apesar deste novo fármaco ter mostrado benefício terapêutico bastante relevante, este também apresenta limitações significativas em termos de custo económico e a sua aprovação atual, pela FDA, é apenas para o tratamento de doentes com FC que possuam a mutação G551D, a qual representa apenas 5% da população com FC. Encontram-se em estudo outros agentes moduladores da CFTR. O ataluren<sup>®</sup> (conhecido como PTC124), um supressor da CFTR, já completou os ensaios clínicos de fase III.

Pode-se, então, concluir que os moduladores da CFTR se apresentam, atualmente, como um campo bastante promissor na investigação de terapêuticas curativas para a Fibrose Cística. O diagnóstico precoce da doença poderá ser uma porta aberta para o sucesso da aplicação, cada vez mais cedo, das novas terapêuticas. Atualmente, ainda em fase piloto, desde o dia 21 de Novembro de 2013 já está a ser realizado em Portugal o rastreio neonatal da Fibrose Cística, o que é revelador da importância que a doença vai assumindo na nossa sociedade.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- [1] CABELLO GMK, “*Avanços da Genética na Fibrose Cística*”, Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Ano 10, pp 36-44, Outubro/Dezembro 2011
- [2] REIS FJC, DAMACENO N, “*Fibrose Cística*”, Jornal de Pediatria, Vol. 74, Supl. 1: S76-S94, 1998
- [3] CASTRO MCS, FIRMIDA MC, “*O tratamento na Fibrose Cística e suas Complicações*”, Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Ano 10, pp 82-108, Outubro/Dezembro 2011
- [4] VANKEERBERGHEN A, CUPPENS H, CASSIMAN JJ. “*The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions*”. J Cystic Fibrosis., Vol. 1, pp. 13-29, 2002
- [5] LOW A and JARAD NA, “*Cystic Fibrosis Liver Disease*”, Department of Respiratory Medicine, Bristol Royal Infirmary, UK – disponível em [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com) (consultado em Julho 2013)
- [6] <http://www.correlagen.com> (consultado em Julho 2013)
- [7] TSUI Lap-Chee and DORFMAN R, “*The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective*”, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine - disponível em <http://www.perspectivesinmedicine.org> (consultado em Julho 2013)
- [8] SINN PL, ANTHONY RM and McCRAY PB, “*Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease*”, Human Molecular Genetics, Vol. 20, Review Issue, R79-R86, 2011
- [9] COHEN-CYMBERKNOH M, SHOSEYOV D and KEREM E, “*Managing Cystic Fibrosis – Strategies that increase life expectancy and improve quality of life*”, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 183, pp 1463-1471, 2011
- [10] DAMAS C, AMORIM A, GOMES I, “*Fibrose Quística: Revisão*”, Revista Portuguesa de Pneumologia, Vol. XIV, Nº1, pp 89-112, Janeiro/Fevereiro 2008
- [11] ROBERTSON MB, CHOE KA, JOSEPH PM, “*Review of the Abdominal Manifestations of Cystic Fibrosis in the Adult Patient*”, RadioGraphics, Vol. 26, Nº 3, pp 679-690, May-June 2006
- [12] CARVALHO CP et al, “*Manifestações Otorrinolaringológicas da Fibrose Cística – Revisão da Literatura*”, Arq. Int. Otorrinolaringol., São Paulo, V. 12, Nº 4, pp 552-558, 2008
- [13] O'REILLY and ELPHICK, “*Development, clinical utility, and place of ivacaftor in the treatment of cystic fibrosis*”, Drug Design, Development and Therapy, 7, pp. 929-937, 2013
- [14] RIBEIRO JD, RIBEIRO MAGO, RIBEIRO AF, “*Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista*”, Jornal de Pediatria, Vol. 78, Sup. 2, S171-S183, 2002
- [15] <http://emedicine.medscape.com/article/939603-overview> (consultado em Julho 2013)
- [16] SARAIVA-PEREIRA ML, FITARELLI-KIEHL M, SANSEVERINO MTV, “*A Genética na Fibrose Cística*”, Ver HCPA, 31(2): 160-167, 2011
- [17] DAVIDSON DJ, PORTEOUS DJ, “*The genetics of cystic fibrosis lung disease*”, Thorax, Vol. 53, pp. 389-397, 1998
- [18] Genetic Home Reference, 2012  
Disponível em <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/chromosomallocation> (consultado em Julho 2013)

- [19] DAVID N. Sheppard and MICHAEL J. Welsh, “*Structure and Function of the CFTR Chloride Channel*”, *Physiological Reviews*, Vol 79, Suppl, Nº 1, January 1999
- [29] Cystic Fibrosis Mutation Database – disponível em [www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr) (consultado em Julho 2013)
- [21] Gene Gateway – Exploring Gene and Genetics Disorders - disponível em [http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/posters/chromosome/](http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/) (consultado em Julho 2013)
- [22] FOLESCU, TW, “*Fibrose cística em adolescentes: um diagnóstico possível*”, *Adolescência & Saúde*, Vol. 5, Nº 3, pp. 44-48, Outubro 2008
- [23] ROWNTREE RK and HARRIS A, “*The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations*”, *Annals of Human Genetics*, 67, pp. 471-785, 2003
- [24] BARRETT PM, ALAGELY A and TOPOL EJ “*Cystic fibrosis in an era of genomically guided therapy*”, *Human Molecular Genetics*, Vol 21, pp. 66-71, 2012
- [25] DAVIS PB, “*Cystic Fibrosis since 1938*”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173, pp. 475-482, 2006
- [26] OCKENGA J, “*Evaluation of role of CFTR in alcohol related pancreatic disease*”, *Gut*, 49, pp. 312-313, 2001
- [27] Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, “*Fibrose Cística – Manifestações Pulmonares*”, Portaria SAS/MS Nº 24, de 10 de maio de 2010 (Retificada em 27.08.10), pp. 323-337
- [28] ZIRBES J, MILLA CE, “*Cystic fibrosis related diabetes*”, *Pediatric Respiratory Reviews* 10, pp 118-223, 2009
- [29] HOFFMANN A, PROCIANOY EFA, “*Infeção Respiratória na Fibrose Cística*”, *Ver HCPA*, 31(2), pp. 216-223, 2011
- [30] MORROW BM *et al*, “*Improvements in lung function of a pediatric cystic fibrosis population in a developing country*”, *Jornal de Pediatria*, Vol. 84, Nº 5, pp. 403-409, 2008
- [31] DALCIN PTR *et al*, “*Percepção da gravidade da doença em pacientes adultos com fibrose cística*”, *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35(1), pp. 37-34, 2009
- [32] <http://www.uptodate.com/contents/cystic-fibrosis-clinical-manifestations-of-pulmonary-disease> (consultado em Julho de 2013)
- [33] LEWIS *et al*, “*Cystic Fibrosis*”, *American Journal of Clinical Pathology*, 120 (Suppl. 1): S3-S13, 2003
- [34] MACHADO LR, RICACHINEVSKY CD, “*Manifestações Gastrointestinais na Fibrose Cística*”, *Ver HCPA*, 31(2), pp. 185-191, 2011
- [35] KING *et al*, “*Hepatobiliary and Pancreatic Manifestations of Cystic Fibrosis: MR Imaging Appearances*”, *RadioGraph*, Vol. 20, Nº 3, pp. 767-777, 2000
- [36] DONADIO MV *et al*, “*Bone mineral density, pulmonary function, chronological age, and age at diagnosis in children and adolescents with cystic fibrosis*”, *Jornal de Pediatria*, 89(2): 151-157, Rio Janeiro, 2013

- [37] ROSA FR *et al*, “*Fibrose Cística: uma abordagem clínica e nutricional*”, Revista de Nutrição, Campinas, 21(6), pp. 725-737, 2008
- [38] COLOMBO C, “*Liver disease in cystic fibrosis*”, Current Opinion in Pulmonary Medicine, 13, pp. 529-536, 2007
- [39] DALCIN PTR, ABREU e SILVA FA, “*Fibrose Cística no adulto: aspetos diagnósticos e terapêuticos*”, Jornal Brasileiro de Pneumologia., 34(2), pp. 107-117, 2008
- [40] GRIESE M & KAPPLER M, “*Effective improvement of cystic fibrosis care by application of elementary measures: essential lessons not only for developing countries*”, Jornal de Pediatria, 84(5), pp. 383-385, 2008
- [41] TORRES L *et al*, “*Clinical, nutritional and spirometric evaluation of patients with cystic fibrosis after the implementation of multidisciplinary treatment*”, Jornal Brasileiro de Pneumologia, 36(6), pp. 731-737, 2010
- [42] “*Fibrose Cística: Diagnóstico e Tratamento*”, Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar, Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Suplementar, pp. 1-13, Janeiro 2011
- [43] FUCHS H *et al*, “*Effect of Aerosolized Recombinant Human DNase on Exacerbations of Respiratory Symptoms and on Pulmonary Function in Patients with Cystic Fibrosis*”, New England Journal of Medicine, 331(10), pp. 637-642, 1994
- [44] RATJEN F and DORING G, “*Cystic Fibrosis*”, The Lancet, Vol. 361, pp. 681-689, 2003
- [45] POHL J, “*Nutrition in Cystic Fibrosis*”, A Special Article, Pratical Gastroenterology, March 2010 (disponível em <http://www.practicalgastro.com/pdf/March10/PohlArticle.pdf> - (consultado em Agosto 2013))
- [46] FLUME PA *et al*, “*Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines – Treatment of Pulmonary Exacerbations*”, Pulmonary Perspective, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 180, pp. 802-808, 2009
- [47] COUSAR-TAYLOR JL *et al*, “*Potential of anti-inflammatory treatment for cystic fibrosis lung disease*”, Journal of Inflammation Research, Vol. 3, pp. 61-74, 2010
- [48] AMIN R, RATIEN F, “*Cystic fibrosis: a review of pulmonary and nutritional therapies*”, Adv Pediatr, Vol. 55, pp. 99-121, 2008
- [49] ROVEDDER PME *et al*, “*Infeção bacteriana crônica e indicadores ecocardiográficos de hipertensão pulmonar em pacientes com Fibrose Cística*”, Jornal Brasileiro Pneumologia, 34(7), pp. 461-467, 2008
- [50] SONG, JC, “*Ivacaftor: A new emerging treatment option in the management of cystic fibrosis*”, 2012, Published on Formulary Journal, disponível em <http://formularyjournal.modernmedicine.com> (consultado em Abril 2014)
- [51] RAMSEY BW *et al*, “*Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis*”, The New England Journal of Medicine, Vol. 340, Nº 1, pp. 23-30, 1999
- [52] <http://www.cff.org/treatments/therapies/respiratory/cayston/> (consultado em Abril 2014)
- [53] ANDERSON P, “*Emerging therapies in cystic fibrosis*”, Ther Adv Respir Dis, 4(3), pp.177-185, 2010

- [54] HOFFMAN LR *et al*, “Cystic Fibrosis Therapeutics - The Road Ahead”, CHEST, Ahead of the Curve, 143, 1, pp. 207-213, 2013
- [55] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00659529> (consultado em Abril 2014)
- [56] LUTZ L *et al*, “Bacteriologia da Fibrose Cística”, Ver HCPA, 31(2), pp. 168-184, 2011
- [57] KONSTAN *et al*, “Clinical use of ibuprofen is associated with slower FEV1 decline in children with Cystic Fibrosis”, Am J Resp Crit Care Med, Vol. 176, pp. 1084-1089, 2007
- [58] TIROUVANZIAM R *et al*, “High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis”, PINAS, Vol 103, Nº 12, pp. 4628-4633, 2006
- [59] <http://www.cff.org/treatments/Therapies/AlternativeTherapies/Antioxidants/> (consultado em Abril 2014)
- [60] DE VIZIA B *et al*, “Effect on an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentanoic and decosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis”, J Parenter Enteral Nutr, 27(1), pp. 52-57, 2003
- [61] ZEMANICK ET *et al*, “Measuring and improving respiratory outcomes in cystic fibrosis lung disease: Opportunities and challenges to therapy”, Journal of Cystic Fibrosis 9, pp. 1-16, 2010
- [62] KELLERMAN D *et al*, “Denufosol: a review of studies with inhaled P2y(2) agonists that led to phase 3”, 21(4), pp. 600-607, 2008
- [63] HURK K and BILTON D, “Inhaled mannitol for the treatment of cystic fibrosis”, Expert Rev Respir Med, 6(1), pp. 19-26, 2012
- [64] Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, “Fibrose Cística – Insuficiência Pancreática”, Portaria SAS/MS Nº 224, de 10 de maio de 2010 (Retificada em 27.08.10), pp. 307-321
- [65] WALKOWIAK J, SANDS D, “Early decline of pancreatic function in cystic fibrosis patients with class 1 or 2 CFTR mutations”, J Pediatr Gastroenterol Nutr, 40 (2), pp. 199-201, 2005
- [66] KRAISINGER M *et al*, “Clinical pharmacology of pancreatic enzymes in patients with cystic fibrosis and in vitro performance of microencapsulated formulations”, J Clin Pharmacol, 34(2), pp. 158-166, 1994
- [67] FERRONE M, RAIMONDO M, SCOLAPIO JS, “Pancreatic enzyme pharmacotherapy”, Pharmacotherapy, 27(6), pp. 910-920, 2007
- [68] SCHNEIDER CD e OLIVEIRA AR, “Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treino físico”, Ver Bras Med Esporte, Vol. 10, Nº 4, pp. 308-313, Jul-Ago 2004
- [69] PEREIRA B, “Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica”, MOTRIZ, Vol 2, pp. 71-80, 1996
- [70] GALLI F *et al*, “Oxidative stress and oxidant therapy in cystic fibrosis”, Biochimica et Biophysica Acta 1822, pp. 690-713, 2012
- [71] CANTIN *et al*, “Antioxidants in cystic fibrosis – conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003”, Free Radic Biol Med. January 1, 42(1): 15-31, 2007



- [72] WOOD LG *et al*, “Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function”, *Am J Clin Nutr*, 77, pp. 150-159, 2003
- [73] L SHAMSEER *et al* “Antioxidant micronutrients for lung disease in cystic fibrosis”, *Cochrane Database Syst Rev*, Dec 8, 2010
- [74] DERICHS N, “Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis”, *Eur Respir Rev*, 22:127, pp. 58-65, 2013
- [75] [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/LFSA-7TAJXQ/disserta\\_o\\_guilherme\\_parte2.pdf?sequence=2](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/LFSA-7TAJXQ/disserta_o_guilherme_parte2.pdf?sequence=2) (consultado em Setembro 2013)
- [76] VEIGA JE, ARAUJO NO, CARDOZO SV, “Terapêutica Gênica – Uma revisão da literatura”, *Saúde & Amb. Ver. Duque de Caxias*, Vol. 4, Nº 2, pp. 20-33, Jul-Dez 2009
- [77] DAVIS PB and COOPER MJ, “Vectors for Airway Gene Delivery”, *AAPS Journal*, 9(1), Article 2, pp. E11-E17, 2007 (disponível em <http://www.aapsj.org>)
- [78] PUTNAM D, “Polymers for gene delivery across length scales”, *Nature Materials*, Vol. 5, Nº 439, pp. 439-451, 2006
- [79] Mc CRUDDEN CM and McCARTHY HO, “Cancer Gene Therapy – Key Biological Concepts in the Design of Multifunctional Non-Viral Delivery Systems”, *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, February 27, 2013 (disponível em <http://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/cancer-gene-therapy-key-biological-concepts-in-the-design-of-multifunctional-non-viral-delivery-syst> - consultado em Setembro 2013)
- [80] RUPONEN M, YLA-HERTTUALA S, URTII A, “Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physiochemical and transfection studies”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1415, pp. 331-341, 1999
- [81] ZHU L and MAHATO RI, “Lipid and polymeric carrier-mediated nucleic acid delivery”, *Expert Opin Drug Deliv*, available in PMC, pp. 1-26, 2011
- [82] MAHATO RI, SMITH LC & ROLLAND A, “Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy”, *Advances in Genetics*, Vol. 41, pp. 95-156, 1999
- [83] VERMA IM, WETTZMAN MD, “Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine”, *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 74, pp. 711-738, 2005
- [84] ARAUJO P, BRAGA E, “Formulações de Anestésicos Locais de Libertação Controlada: Aplicações Terapêuticas”, *Rev Bras Anesthesiol*, Vol. 53, Nº 5, pp. 663-671, 2003
- [85] ROSSI-BERGMANN B, “A Nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico”, *Artigos e Ensaios, Cienc. Cult.*, Vol. 60, Nº 2, pp. 54-57, 2008
- [86] FAN Y and ZHANG Q, “Development of liposomal formulations: from concept to clinical investigations”, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 8, pp. 81-87, 2013
- [87] <http://www.malvern.com.br/labpor/sample-type-form/liposome-micellesurfactants.htm> (consultado em Setembro 2013)



- [88] CONCEIÇÃO FS *et al*, “Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares”, Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa ISSN 1646-0480, 6, pp. 50-59, 2009
- [89] <http://quimicaparatodosuevora.blogspot.pt/2011/01/lipossomas-e-as-suas-aplicacoes-na.html> (consultado em Setembro 2013)
- [90] CHORILLI M *et al*, “Lipossomas em formulações dermocosméticas”, Infarma, Vol.16, Nº 7-8, pp.75-79, 2004
- [91] BATISTA CM, CARVALHO CMB, MAGALHÃES NSS, “ Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte”, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Vol. 43, Nº 2, pp. 167-179, Abr/Jun 2007
- [92] MACHADO LC, GNOATTO SA, KLUPPEL MLW, “Lipossomas Aplicados em Farmacologia: Uma revisão da literatura”, Estud. Biol. 29(67), pp. 215-224, Abr/Jun 2007
- [93] PILIPPIN FB e SOUZA LC, “Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B”, Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas, Vol. 42, Nº2, pp. 167-194, 2006
- [94] <http://www.ambisome.com/MOA.aspx> (consultado em Abril 2014)
- [95] ADLER-MOORE J and PROFFITT R, “AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience”, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49, Suppl. S1, pp. 21-30, 2002
- [96] GILL DR *et al*, “A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis”, Gene Therapy, Vol. 4, pp. 199-209, 1997
- [97] LEE TWR, MATTHEWS DA and BLAIR E, “Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy”, Biochem. J., Vol. 387, pp. 1-15, 2005
- [98] SAFINGA CR *et al*, “Cationic liposome-DNA complexes: from liquid crystal science to gene delivery applications”, Phil. Trans. R. Soc. A., Vol. 364, pp. 2573-2596, 2006
- [99] HYDE SC *et al*, “Repeat administration of DNA/lipossomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis”, Gene Therapy, Vol. 7, pp. 1156-1165, 2000
- [100] CAPLEN NJ *et al*, “Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis”, Nat Med, Jan, 1(1), pp. 39-46, 1995
- [101] PORTEOUS DJ *et al*, “Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis”, Gene Therapy, Vol. 4, pp. 210-218, 1997
- [102] ALTON EW *et al*, “Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial”, Lancet, Vol. 353(9157), pp. 947-954, 1999
- [103] KOTRA LP, HADDAD J and MOBASHERY S, “Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance” Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 44, pp. 3249-3256, 2000
- [104] WILSCHANSKI M *et al*, “Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations”, New England Journal of Medicine, 349, pp. 1433-1441, 2003

- [105] WILSCHANSKI M *et al*, “*Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis*”, Eur Respir J, 38, pp. 59-69, 2011
- [106] SERMET-GAUDELUS I, “*Ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation*”, Eur Respir Rev, 22:127, pp.66-71, 2013
- [107] <http://unidospelavida.org.br/futuros-medicamentos-para-fibrose-cistica-fc/> (consultado em Abril 2014)
- [108] [http://www.nature.com/nrd/journal/v11/n5/fig\\_tab/nrd3723\\_F1.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v11/n5/fig_tab/nrd3723_F1.html) (consultado em Abril 2014)
- [109] [http://pi.vrtx.com/files/uspi\\_ivacaftor.pdf](http://pi.vrtx.com/files/uspi_ivacaftor.pdf) (consultado em Abril 2014)
- [110] [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/002494/WC500130744.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002494/WC500130744.pdf) (consultado em Abril 2014)
- [111] <http://www.thoracic.org.au/imagesDB/wysiwyg/SatAUD21345JaneBourke.pdf> (consultado em Abril 2014)
- [112] GOOR FV *et al*, “*Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770*”, PINAS, Vol 106, Nº 44, pp. 18825-18830, Nov 3, 2009
- [113] CONDREN ME and BRADSHAW MD, “*Ivacaftor: A novel gene-based therapeutic approach for cystic fibrosis*”, J Pediatr Pharmacol Ther, Vol. 18, Nº 1, pp. 8-13, 2013
- [114] YU H *et al*, “*Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations*”, Journal of Cystic Fibrosis 11, pp. 237-245, 2012
- [115] FLUME PA *et al*, “*Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation*”, CHEST, 142, 3, pp. 718-724, 2012
- [116] KALYDECO, Assessment report, European Medicine Agency, Committee for Medical Products for Human Use (CHMP), 2012